

Betydning av trunkert
APC-protein i HEK293
celler for overlevelse og
dannelse av DNA-skader

Av Heidi Norun Nyland

Masteroppgave i Toksikologi
Program for integrativ biologi
Biologisk institutt
Universitetet i Oslo
Desember 2008

Forord

Denne masteroppgaven ble utført på Nasjonalt folkehelseinstitutt, Divisjon for miljømedisin, Avdeling for mattrygghet og ernæring. Formålet med prosjektet var å undersøke betydningen av forkortet APC-protein i HEK293- celler for overlevelse og dannelse av DNA-skader.

Jeg vil først og fremst takke min veileder Trine Husøy for all hjelp med masterarbeidet. Hun har alltid vært tilgjengelig og velvillig til å hjelpe til både med den eksperimentelle delen og under skriveprosessen. En stor takk til deg! Jeg takker også min andre veileder Ketil Hylland for hjelp under skriveprosessen.

Videre vil jeg takke hele avdelingen for all hjelp jeg har fått, og da spesielt Tone Rasmussen og André Larsen som har hjulpet meg mye med den eksperimentelledelen.

Deler av den eksperimentelle delen (kometmetoden) er utført på Avdelingen for kjemikalietoksikologi (MIKT), og i den sammenheng vil jeg takke MIKT for hjelp under arbeidet og for et bra samarbeid. Jeg vil spesielt rette enn takk til Kristine Bjerve Gutzkow og Gunnar Brunborg.

Jeg vil også takke min medstudent Salma Shahzadi for å være en god støtte i disse årene, samt familie og til slutt, men ikke minst, min forlovede, Vidar Hansen for hjelp med oppgaven, all støtte og for å ha gitt meg motivasjon til arbeidet.

Lindern, Desember 2008

Heidi Norun Nyland

Sammendrag

Adenomatous polyposis coli (*APC*) genet er uttrykt i de fleste vev og koder for et stort tumor supressor protein med mange funksjoner. Mutasjoner i *APC* er en av de tidligste årsakene til utvikling av både den arvelige typen av tarmkreft, familiær adenomatous polyposis (FAP) og spontan tarmkreft. De biologiske funksjonene til *APC*-proteinet er uklare, selv om mange proteiner som samhandler med *APC* er kartlagt.

En mutasjon i *APC* fører til aktivering av Wnt-reaksjonsveien noe som fører til akkumulering av β -katenin som kan translokeres til kjernen. Der virker den som en transkripsjonsfaktor og fører til transkripsjonsaktivering av en mengde proliferative gener

APC spiller også en viktig rolle i å regulere cytoskjelettet ved å stimulere Asef, en Rac-spesifikk nukleotid “exchange factor”. De fleste humane tarmsvulstene (85%) er i stor grad aneuploide og har dermed et unormalt antall kromosomer. Selv om man i mange år har visst at humane tumorer er hyppig aneuploide, var det først nylig det ble vist at dette skyldes en underliggende kromosom ustabilitet (CIN). Celler fra tarmsvulster er spesielt utsatte for kromosom ustabilitet (CIN). På tross av alminnelig forekomst i svulster, er mekanismene som bidrar til CIN lite forstått.

Trunkerte *APC*- mutasjoner har en dominant effekt som kan resultere i kromosom ustabilitet. Disse resultatene setter søkelys på at *APC*-mutasjoner kan ha onkogene egenskaper og at dette skyldes initiering av CIN, som igjen fører til akkumulering av andre mutasjoner, inkludert tap av det sekundære *APC*-allelet.

Dette kan ha betydning for reparasjon av DNA-skader, spesielt homolog rekombinasjon.

I denne masteroppgaven ble det benyttet humane embryo nyreceller (fra Storbritannia), HEK293, som var transfektert med *APC*- gen med tre ulike mutasjoner. Disse mutantene, N750, N1309 og N1807 ble alle uttrykt som Myc-proteiner og kodet for den første 750, 1309 og 1807 aminosyren av *APC*-genet.

Vi var interessert i å finne ut om HEK293-celler med og uten trunkert *APC* har ulik overlevelse etter behandling som øker DNA-skader. Og om trunkert *APC* påvirker dannelsen og reparasjon av DNA-skader i HEK293-celler.

Det ble først kjørt western for å påvise trunkeringene i cellene. Deretter ble overlevelse målt ved MTT-assay metoden etter eksponering med det DNA-skadelige stoffet MMS. Tilslutt ble det sett på DNA-reparasjon etter eksponering med MMS og Camp., og røntgenstråling og FPG-enzym ved hjelp av Kometmetoden.

Resultatene viste at HEK293-celler med normalt *APC* hadde lavere overlevelse enn celler med trunkert *APC* etter behandlet med det DNA skadelige stoffet MMS. HEK293 N750-cellene hadde lavest overlevelse av de trunkerte cellene, mens N1309- cellene hadde den høyeste overlevelsen. I tillegg viste kometmetoden at HEK293-celler med normalt *APC* fikk en raskere økning i dannelse av DNA skader med MMS og strålebehandling enn N750-cellene med trunkert *APC*.

Kometforsøkene tyder på at N750-cellene reparerer DNA-skadene noe langsommere enn HEK293-cellene med normalt *APC*. Dette underbygges av et høyere antall DNA-skader i de trunkerte N750- cellene over tid, og en større økning i DNA-skader ved behandling med Camp. Dette kan skyldes redusert reparasjon av DSB.

Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING	9
1.1 APC	10
1.1.1. APC og Wnt-signalveien	11
1.1.3 APC og ”to-trinns-modellen”	14
1.1.4 DNA-reparasjon	15
1.1.5 APC og alkylende agenter	17
1.1.2 APC og reparasjon	19
1.2 P53	22
1.3 Celledød	22
1.4 Cellelinjer med APC-funksjon	23
1.4 Problemstilling	24
2.0 MATERIAL OG METODE	25
2.1 Etablering av cellelinjer	25
2.2 Westernmetoden	25
2.2.1 Bearbeide celler til western	26
2.2.2 Proteinmåling ved hjelp av acetonefelling	27
2.2.3 Western kjøring	28
2.3 MTT-celle Proliferasjon og Viabilitet assay (MTT-assay)	31
2.4 Alkalisk enkeltcelle gel- elektroforese (Komet) assay	32
2.4.1 Utsåing og eksponering	32
2.4.2 Høsting av celler	34
2.4.3 Laging av løsninger	34
2.4.4 Støping av agarosegeler m /celler	34
2.4.5 Behandling med Formamido pyrimidine glycosylase (FPG)- enzym	34
2.4.6 Unwinding i elektroforesebuffer og elektroforese	35

2.4.5 Avlesning av filmene	35
2.5 Statistikk.....	35
3.0 RESULTAT	37
3.1 Etablering av celledinjer	37
3.2 western	37
3.3 MTT- assay	39
3.3.1 Uten Tetra.....	39
3.3.2 Med Tetra.....	40
3.4 Kometmetoden	41
3.4.1 Høsting av celler.....	42
3.4.2 Vasking etter trypsinering	42
3.4.3 Dose responskurve	43
3.4.4 Tidskurve.....	44
3.4.5 Camptothecin	45
3.4.6 Røntgenstråling og FPG	47
4.0 DISKUSJON.....	50
4.1 Konklusjon	57
4.2 Videre arbeid	57
5. REFERANSELISTE	58
6. Vedlegg 1	67
6.1 Kjemikalier.....	67
6. 2 Produkter og produsenter	71

Forkortelser

Antikanin sekundærantistoff: Polyclonal Goat Anti- Rabbit Immunoglobulins/ HRP

Antimus sekundærantistoff: Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunoglobulins

ANOVA: Annalyse av varainsen

APC: Adenomatous polyposis coli (humant)

Apc: Adenomatous polyposis coli (fra mus)

APS: Ammonium persulfat

BER: Base-eksisjonsreparasjon

BSA: Bovine serum albumin

Camp.: Camptothecin

CIN: kromosom ustabilitet

DBS: double strand break

dH₂O: Destilert vann

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium m/ high glukose

DNA: Deoxyribonucleic acid

EDTA: Ethylenediaminetetraacetin acid

FAP: Familiær adenomatous polyposis

FCS: Foetal Bovine Serum

Fen-1: flap endonuclease

FPG: Formamido pyrimidine glycosylase

HR: Homolog rekombinasjon

LOH: Tap av heterozygositet

MCR: Mutasjon klyngeregionen på *APC*

Min-mus: "Multiple intestinal neoplasia (Min)" mus

MMS: Methylmethane sulfonate

NER: Nukleotid- eksisjonsreparasjon

NHEJ: Nonhomolog end-joining

PBS: Fosfat buffer løsning

Pierceløsning: SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate

Pol β : DNA-polymerase β

RAS: Rokitansky- Aschoff sinus

SCEs: Søster kromatid utveksling.

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SSB: Single Strand Break

TEMED: N, N, N', N'-tetra-methyl- ethylenedamine

Tris-base: Trizma base

1. INNLEDNING

Kreft er en av vår tids store folkesykdommer med over 23 000 nye årlige tilfeller i Norge og antallet er antatt å stige til anslagsvis 28 000 i 2020. Ifølge tall fra Statistisk sentralbyrå skyldes nå hvert fjerde dødsfall i Norge kreft. (Helsedirektoratet 2007).

Kreft er et paraplybegrep som dekker mange tilstander som er karakterisert av ukontrollert celledeling. Og mens gjennomsnittsalderen øker jevnt og trutt i mange land, øker også kreftrelaterte dødsfall slik at kreft vil være en av de vanligste dødsårsakene i det 21. århundret (Nature 2001).

Kreft skyldes en serie av mutasjoner i ulike gener etterfulgt av en selektiv vekst av de forskjellige etterkommerne med de sterkeste egenskapene for celledeling og/eller overlevelse (van Es, Giles, & Clevers 2001). Årsakene til kreft er mange og varierte, og inkluderer blant annet genetisk predisposisjon, miljømessig påvirkning, infiserende agenter og aldring (Nature 2001).

Genene som hyppigst er funnet mutert i kreftceller kan deles inn i to klasser, protoonkogener og tumorsuppressorgener (van Es, Giles, & Clevers 2001). Onkogener er muterte protoonkogener (det normale genet), hvor en gitt funksjon blir slått på som følge av mutasjoner. Disse mutasjonene kan kalles ”slå på funksjon” mutasjoner (Hunter 1997). ”Slå på funksjon” mutasjonene resulterer i proteiner med en over- eller abnorm uttrykking av normale genprodukter eller en uttrykking av et endret genprodukt. Denne aktiveringen vil bidra til stimulering av cellevekst, hemming av apoptose, og/eller differensiering (van Es, Giles, & Clevers 2001).

Klassen av protoonkogener inneholder en stor variasjon av gener inkludert cytoplasmiske budbringere (f. eks Rokitansky-Aschoff sinus (RAS)), transkripsjonsfaktorer (f. eks MYC), og vekstfaktorgener (f. eks Wnt) (van Es, Giles, & Clevers 2001).

I motsetning til onkogener mister tumorsuppressorgener sin funksjon når de blir muterte, og kan kalles ”tap av funksjon” mutasjoner (Yeo 1999). For at funksjonen skal bli borte må begge alleler muteres. Under normale tilstander er tumorsuppressorproteinene involvert i

hemming av celleveksten, stimulering av differensiering og/eller stimulering av aktiv celledød (apoptose). Klassen inkluderer regulatorer av cellesyklusen (f. eks RB), regulatorer av signaloverføringsreaksjonsveier (f. eks. *APC*), og transkripsjonsfaktorer (f. eks WT-1). Denne klassen inkluderer også gener involvert i DNA-reparasjonsveien (f.eks hMSH2). DNA-reparasjonsgener har en mer indirekte rolle i kreftutviklingen, men siden de blir påvirket av ”tap av funksjon” mutasjoner regnes de vanligvis til denne klassen (van Es, Giles, & Clevers 2001).

Over tid vil DNA akkumulere forandringer som vil aktivere protoonkogener og inaktivere tumorsuppressorgener. Den genetiske ustabiliteten som driver tumorigenesen får blant annet næring fra DNA-skader og feil som blir gjort ved DNA-reparasjon (Hoeijmakers 2001).

1.1 *APC*

Adenomatous polyposis coli (*APC*) genet er uttrykt i de fleste vev og koder for et stort, ~310-kDa, tumorsuppressorprotein med mange funksjoner (Polakis 2007). Genet som koder for humant *APC* er lokalisert i kromosombånd 5q21-q22 og består av 16 transkriberte eksoner. Størrelsen på eksonene 1-16 er fra 85 til 398 bp, mens ekson 15 er 6574 bp langt. Det er på ekson 16 de fleste mutasjonene oppstår (van Es, Giles, & Clevers 2001). *APC*-proteinet er lokalisert både i cytoplasma og i cellekjernen (Narayan & Roy 2003).

Mutasjoner i *APC* er en av de tidligste årsakene til utvikling av både den arvelige typen av tarmkreft, familiær adenomatous polyposis (FAP) og spontan tarmkreft (Nagase & Nakamura 1993). Nedarvet mutasjon i et allel i *APC*-genet gir opphav til FAP, som er en sjelden arvelig predisposisjon for tarmkreft (Grodin et al. 1991, Kinzler et al. 1991). Sykdommen karakteriseres av at det dannes mellom hundre og tusen polypper (adenomer) i tarmen. Adenomer er utvekster i tarmslimhinnen som i utgangspunktet er godartede, men som har evnen til å utvikle seg til kreftsvulster (Helse Bergen, 2005). Siden det ene allelet allerede er skadet, vil det andre allelet være utsatt for skade fra for eksempel miljøpåvirkning (Kinzler & Vogelstein 1996). Videre har rundt 80 % av alle svulster i den ikke arvelige formen av tarmkreft, spontan tarmkreft, en mutasjon i *APC* (Miyoshi et al. 1992). I de fleste tilfellene av spontan tarmkreft er det påvist mutasjoner eller endringer i begge *APC*- allelene (Rowan et al. 2000).

Et lite antall av alle tarmsvulster beholder fortsatt et villtype *APC*-allel (Segditsas & Tomlinson 2006). I disse tilfellene vil det ene muterte *APC*- allelet bidra til utvikling av

sykdommer i kombinasjon med endringer på andre gener/ proteiner, som deltar i reaksjonsveien relatert *APC*'s funksjon (Constancio-Lund, Brabek, & Hanks 2008)

I tillegg til svulster i tarmen, er skader på andre vev og organer hyppig observert hos FAP-pasienter. Disse inkluderer desmoide svulster, polypper i tolvfingertarmen og magen, knokkelsvulster, epidermoidecyster, medfødt hypertrofi av netthinnepigmentepitelium (CHRPE), skader på netthinnen og hjernesvulster (van Es, Giles, & Clevers 2001). Videre har det blitt observert økning av nyresvulster hos mus med inaktivert *APC*-gen (Sansom et al. 2005), og epigen inaktivering av *APC* på grunn av DNA-metylering, er hyppig representert i både brystkreftceller og vev fra brystkreft (Van, I et al. 2008).

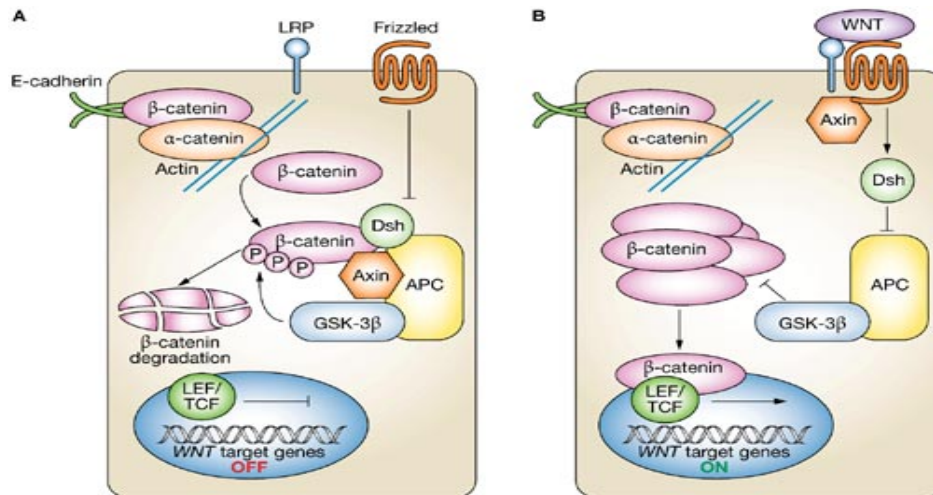
De fleste kreftrelaterte mutasjonene i *APC*-genet fra den siste typen rammer en sentralt lokalisert ~300 aminosyresekvens kjent som mutasjonklyngeregionen (MCR). Denne mutasjonen introduserer premature stoppkodoner. Dette resulterer i dannelse av et *APC*-protein som er forkortet C-terminalt og som har økt mobilitet og endret funksjon (Fodde, Smits, & Clevers 2001, Polakis 2007).

De biologiske funksjonene til *APC*-proteinet er ikke fullt ut kjent, selv om mange proteiner som samhandler med *APC* er kartlagt.

1.1.1. *APC* og Wnt-signalveien

Tumorsupressorfunksjonen til *APC* er nå veldokumentert (Bienz & Clevers 2000, van Es, Giles, & Clevers 2001). *APC* er en sentral komponent i wnt-signalveien. Wnt er viktig i reguleringen av cellevekst og differensiering. Uten Wnt-signaler, vil *APC* fremme fosforylering av β -katenin gjennom glykogen syntase kinase- 3β (GSK- 3β) og aksin, noe som fører til nedbrytning av β -katenin (Alberts 2002). En mutasjon i *APC* vil derfor føre til en aktivering av Wnt-reaksjonsveien og forhindre *APC* / GSK 3β -mediert fosforylering av β -katenin. β -katenin vil dermed akkumulere og kan translokere til kjernen, hvor den virker som en transkripsjonsfaktor og fører til transkripsjonsaktivering av en mengde proliferative gener (Fearhead, Britton, & Bodmer 2001, van Es, Giles, & Clevers 2001) (Figur 1). Begge *APC*-allelene må gå tapt før dette skjer (Alberts 2002). I mange celler har tap av *APC*-funksjon gjennom C-terminal trunkering eller mutasjoner i onkogenet β -katenin resultert i akkumulering av β -katenin i cytosol (Juwana et al. 1999).

Akkumulering av Wnt-signalveien med økt β -katenin observeres i de fleste tarmsvulster hos mus, som en følge av fravær av APC-funksjon (Taketo 2006).



Figur 1: Wnt-signalreaksjonsveien. (A) Uten WNT-aktivering vil β -katenin blir angrepet og brutt ned via APC/aksin/glycogen synthase-kinase 3 β reaksjonsveien (GSK- 3 β) (B) Når Wnt bindes til frizzled (høyre), blir dishevelled (Dsh) aktivert og frigir β -katenin fra adenomatous poliposis coli komplekset (APC), β -katenin kan dermed virke som transkripsjonsfaktor, og mediere transkripsjon av målgener. LEF, lyfroid enhancer-bindingsfaktor; LRP, LDL-reseptor-relaterte proteiner; P, fosforylering; TCF, T-cellefaktor (McDonald et al. 2006).

1.1.2 APC og cytoskjelettet

Fordeling av kromosomene i celledelingen krever tilstrekkelig oversikt over den mitotiske spindelen og suksessfull bevegelse av kromosomene på spindel- mikrotubulene. Disse begivenhetene innebærer at mikrotubuli pluss-enden tilknyttes cellens kortex og kinetokorene (McNally 2001). Etter tilknytting tror man at det er kombinasjonen av krefter generert av motorproteiner og dynamikken til mikrotubuli, som bidrar til flytting av kromosomer i mitiosen (Scholey, Brust-Mascher, & Mogilner 2003). Derfor kan en redusert tilknytning av spindel- mikrotubuli i mitiosen resultere i feilpostering av den mitiotiske- spindelen eller defekter i kromosomfordelingen. På tross av identifiseringen av et stort antall av proteiner som er kritisk for kromosomfordelingen, er forståelsen av den nøyaktige karakteren til

mikrotubulitilknytningen og reaksjonsveien som regulerer tilknytningen mangelfull (Cheeseman, Drubin, & Barnes 2002).

APC er et multifunksjonelt protein (van Es, Giles, & Clevers 2001), som også spiller en viktig rolle i reguleringen av cytoskjelettet på grunn av stimuleringen av Asef, en Rac-spesifikk nukleotid “exchange factor”. *APC* regulerer aktin- cytoskjelettnettverket og cellemorfologiene (Kawasaki et al. 2000). I tillegg har det vist seg at villtype *APC*, men ikke mutert *APC*, kan binde og stabilisere mikrotubulicytoskjelettet (Smith et al. 1994), både in vivo og in vitro (Zumbrunn et al. 2001). Ved å lokalisere til plussenden av mikrotubule vil *APC* binde seg til membranproteiner i områder av cellen som aktivt migrerer (Mimori-Kiyosue, Shiina, & Tsukita 2000).

Det har blitt vist at fragmenter fra N-terminalen til *APC*, som ofte finnes i svulster, kan oppføre seg annerledes enn full-lengde *APC*. For eksempel virker det som om N-terminale *APC*-fragmenter øker aktiviteten til ASEF mer enn full-lengde *APC*. Dette kan tyde på at tumor-assosierte, N-terminale *APC*-fragmenter er mer effektive i å regulere cellemigrasjon ved å bruke ASEF (Kawasaki, Sato, & Akiyama 2003)

Su et al. (1995) oppdaget EB/RP, familien av proteiner som bindes til den C-terminale delen av *APC*. Disse proteinene kalles EB1 og RP1. (Su et al. 1995). EB1 er et mikrotubuli bundet protein som bindes til C-terminalen til *APC* ved både interfase og mitiose (Juwana et al. 1999). EBI lokaliseres til centrosom (Louie et al. 2004) og i flere systemer har EBI relaterte proteiner vist seg å være nødvendige for samling og posisjonering av den mitotiske- spindel, noe som indikerer at EBI har en viktig rolle for en korrekt kromosomfordeling (Beinhauer et al. 1997). Beinhauer (1997) antyder at *APC* også spiller en rolle i kromosomfordelingen.

I celler fra pattedyr lokaliseres *APC* til centrosomer i interfase (Louie and et al. 2004). I tillegg lokaliseres *APC* til kinetokoren i mitosen på en mikrotubuli avhengig måte. (Fodde et al. 2001). Embryo stam (ES) celler som bar en homozygot trunkert *APC*-mutasjon viste kromosom og spindel unormalheter, noe som ga genetiske beviser for at *APC* har en rolle i kromosomfordelingen. Abnorm spindelstruktur og svekket kinetokormikrotubuli-tilknytning har også blitt rapportert i humane celler med *APC*-mutasjoner (Fodde et al. 2001). *APC* har også vist seg å samhandle med spindelsjekkpunkt proteinene Bub1 og BubR1. Bub1 og

BubR1 kan også fosforylere *APC* in vitro, en reaksjon som blir fremmet av fosforylering av GSK3 β (Kaplan et al. 2001).

De fleste humane tarmsvulstene (85 %) er i stor grad aneuploide og har dermed et unormalt antall kromosomer (Tighe, Johnson, & Taylor 2004). Selv om man i mange år har visst at humane tumorer er hyppig aneuploide, ble det først påvist av (Lengauer, Kinzler, & Vogelstein 1997) at dette skyldes en underliggende kromosomustabilitet (CIN) fenotype.

Celler i tarmsvulster er spesielt utsatt for kromosom ustabilitet (CIN), og allelisk ubalanse har blitt observert i tidlige adenomer i tarmen, i samsvar med en potensiell rolle for CIN i tumor progresjonen (Lengauer, Kinzler, & Vogelstein 1997). Signifikansen av disse forandringene når det gjelder utviklingen av kreft er imidlertid kontroversiell (Sieber et al. 2002).

På tross av alminnelige forekomster i svulster, er forståelsen av mekanismene som bidrar til CIN liten. Cellefusjon- eksperimenter har vist at CIN har en dominant genetisk kvalitet, og det er foreslått at årsaken til CIN kan være mutasjon i et såkalt ”gatekeeper” (”portvakt”) gen som kan bidra til CIN (Lengauer, Kinzler, & Vogelstein 1997). Egenskapene til dette ”portvakt” genet er imidlertid ikke avdekket. En mulig forklaring kan være at mutasjoner hos mitotiske ”sjekkpunkt” proteiner kan indusere CIN, men hittil har slike mutasjoner sjeldent blitt funnet i human kreft (Cahill et al. 1998). Green (2003) viste at trunkerte *APC*-mutasjoner har en dominant effekt som kan resultere i kromosom ustabilitet. Disse resultatene setter søkelys på at *APC*-mutasjoner kan ha onkogene egenskaper og at dette skyldes initiering av CIN, som igjen fører til akkumulering av andre mutasjoner, inkludert tap av det sekundære *APC*-allelet (Tighe, Johnson, & Taylor 2004).

Graden av celleøkning blir balansert av celledød og differensiering. Det har blitt dokumentert at *APC* har en rolle i reguleringen av apoptose, men mekanismene bak dette er uklar. Spesielt forstås ikke hvordan proteinene i cytoskjelettet bidrar til denne prosessen. (Nathke 2006). For at apoptose skal finne sted, trengs aktin og mikrotubuli (Lane, Allan, & Woodman 2005, Moss et al. 2006). Derfor er det trolig at et tap av *APC* påvirker apoptose (Nathke 2006).

1.1.3 *APC* og ”to-trinns-modellen”

Analyser av svulster fra FAP-pasienter og ”multiple intestinal neoplasia” (Min)-mus, en musemodell for FAP, har vist at tap av *APC* skjer i to trinn, og at det trolig er en korrelasjon

mellom de ”to- trinnene” på *APC* på den måten at det er en korrelasjon mellom de begynnende germline *APC*-mutasjonene og karakteren til de andre somatiske mutasjonene (Lamlum et al. 1999). Spesielt er germlinemutasjoner rundt kodon 1,300 assosiert med tap av det gjenværende villtype *APC*-allelet, mens mutasjonene 3’ og 5’ på denne regionen hovedsakelig viser en annen trunkert mutasjon. En lignende sammenheng mellom *APC* - mutasjoner i sporadisk tarmkreft har også blitt observert (Rowan et al. 2000). Det har derfor blitt foreslått at forskjellig N-terminale *APC*-fragmenter har forskjellig dominante negative egenskaper. Ut fra en slik teori vil *APC* ha onkogene egenskaper (Tighe, Johnson, & Taylor 2004).

Dette vil si at celler og vev med et forkortet *APC*-protein vil ha funksjonsendringer som følge av den ”dominant-negativ” effekten av forkortet *APC*. På grunn av dette vil det gjenværende villtype *APC*-allelet være utsatt for mutasjoner og skader. Dette skyldes at N-terminale fragmenter av *APC* bindes til hverandre og til full-lengde endogent *APC* i et tidlig stadium av svulstdannelsen når villtype allelet fortsatt er til stede. Forståelsen av hvordan disse interaksjonene modulerer eller regulerer funksjonen til *APC*-protein er mangelfull. Fenotype forskjeller som blir produsert av de forskjellige trunkerte formene av *APC* kan være relatert til forskjeller i de trunkerte fragmentenes muligheter til å ta del i disse interaksjonene (Nathke 2006).

Teorien støttes av at fravær av *APC*- funksjon finnes i de fleste tarmsvulster, mens mutasjoner i β -katenin forekommer sjeldent, selv om dette ville gi samme effekten med aktivering av wnt-signalveien (Sparks et al. 1998, Sparks, Rider, & Kay 1998).

1.1.4 DNA-reparasjon

Både eksogene og endogene mutagener kan angripe genomet i levende celler noe som kan generere skader på DNA-basene. Disse skadene kan være cytotoksiske og/ eller føre til feilkoding, og de antas å være en stor kilde til mellomprodukter i tumorgenese og karsinogenese (Krokan, Standal, & Slupphaug 1997). For å reparere slike skader har cellen flere aktive DNA-reparasjonssystemer som effektivt fjerner skadet DNA. Ingen av reparasjonssystemene kan reparere alle de forskjellige typene av DNA-skader. Derfor finnes det minst fire, delvis overlappende DNA-reparasjonssystemer hos pattedyr. Det er nukleotid-eksisjonsreparasjon (NER), base-eksisjonsreparasjon (BER), homolog rekombinasjon (HR) og nonhomolog end-joining (NHEJ) (Hoeijmakers 2001, Lindahl & Wood 1999).

NER tar seg av den vide klassen av heliks-forstyrrende skader som påvirker paring av basene og som generelt blokkerer transkripsjon og normal replikasjon. Små kjemiske endringer av baser blir reparert av BER. Disse skadene kan ikke påvirke transkripsjonen og replikasjonen, selv om de ofte fører til feilkoding. BER er derfor spesielt viktig for å motvirke en økning av mutasjoner. NER tar seg av skader fra eksogene kilder, mens BER som oftest, men ikke alltid, tar seg av skader fra endogene kilder. Skader fra disse to systemene påvirker bare en av DNA-trådene (Hoeijmakers 2001).

Ved dobbeltråddbrudd (DSB) trer HR eller NHEJ i kraft for å reparere skadene (Shrivastav, De Haro, & Nickoloff 2008, Sonoda et al. 2006). DSB er mer problematisk å reparere siden begge DNA-trådene er påvirket. For å gjøre dette skikkelig må cellen vite hvilke ender som hører sammen, noe som er vanskelig på grunn av størrelsen på pattedyrs genom. Homolog rekombinasjon virker å være dominant i S og G2 fasen av cellesyklusen når DNA blir replikert. Den fører til en ny kopi av sekvensen (søster kromatid) for å rette opp bruddene (Hoeijmakers 2001).

Det finnes ingen fullgod metode for å måle HR. Reparasjon kan måles indirekte ved nedgang i DNA-skader over tid etter en behandling. DSB tar lengre tid å reparere enn enkeltråddbrudd (SSB). Det finnes flere metoder som kan måle reparasjon via NER og BER (Gaivao et al. 2007, Pines et al. 2008, Sauvaigo et al. 2004).

Den mindre nøyaktige NHEJ er mer relevant i G1-fasen av cellesyklusen, når en ny kopi ikke er tilgjengelig (Takata et al. 1998). HR er ansett som en mer nøyaktig mekanisme for reparasjon av DSB på grunn av at ødelagte ender bruker homologe sekvenser andre steder fra genomet (søster kromatider, homologe kromosomer, eller repeterte regioner på samme eller forskjellige kromosomer) som mal for reparasjonssyntesen. Om reparasjonstemplatet er helt homologt kan reparasjonen bli 100 % riktig. Til og med i disse tilfellene finnes det imidlertid forskningsstudier på gjær som indikerer at reparasjonspolymerasen er mer tilbøyelig til å gjøre feil enn replikasjonspolymerasen, og at punktmutasjoner finner sted i økt frekvens rundt DSB-reparasjonsstedet (Strathern, Shafer, & McGill 1995).

Med unntak av søsterkromatider, er reparasjonstemplater ofte ikke ordentlige homologe, og i disse tilfellene resulterer HR i tap av heterozygositet (LOH) (Shrivastav, De Haro, & Nickoloff 2008).

Overkryssing blir assosiert med en brøkdel av HR-tilfellene og kan ha en stabiliserende eller destabiliserende effekt på genomet. I meiosen utgjør overkryssing en seriøs risiko for endringer av genomet. Halvparten av overkryssingen mellom homologe i G2 fasen resulterer i LOH (Shrivastav, De Haro, & Nickoloff 2008).

Mutant gjær som mangler nøkkelproteiner for HR (f.eks Mre11, Rad51, Rad52, Rad54) er levedyktige, men DSB forblir ofte ureparert og dette resulterer i celledød hos haploide celler. Diploide celler overlever ofte tapet av et ødelagt kromosom. (Krishna et al. 2007, Signon et al. 2001). I kontrast vil tap av HR proteiner hos høyere eukaryoter, inkludert RAD51, BRCA1 og BRCA2 føre til celle og/ eller embryo dødelighet. Levedyktige mutanter i disse tilfellene bærer typisk hypomorfiske- alleler eller så blir dødelighet undertrykt av p53 mutasjoner. I andre tilfeller vil mutasjoner i HR-proteiner hos høyere eukaryoter føre til mildere skader enn hos gjær (Bezzubova et al. 1997, Dronkert et al. 2000, Essers et al. 1997). At RAD51 og BRCA1/2 er viktigere for høyere eukaryoter reflekterer den sentrale rollen som HR har i å restarte blokkert eller ødelagt replikasjongs-gaffel. Dette trengs det trolig flere hundre ganger mer av i høyere eukaryoter enn i gjær siden genomet til høyere eukaryoter er 100 ganger større enn genomet til gjær. (Yang et al. 2002).

1.1.5 APC og alkylerende agenter

DNA-alkylerende agenter er vidt utstrakte mutagener og karsinogener i miljøet (Peto et al. 1984) I tillegg blir flere alkylerende agenter brukt i kreftkjemoterapi (Blasiak et al. 2004).

Methylmethane sulfonate (MMS) er en alkylerende DNA-agent. Stoffet har blitt brukt i mange år som en DNA-skadende agent som induserer mutagenese og i rekombinasjonseksperimenter. MMS gjør at både guanin (til 7-metylguanin) og adenin (til 3-metyladenin) feilparer og blokkerer replikasjonen (Beranek 1990). DNA skader som dannes av alkylerende agenter blir hovedsakelig reparert av BER og DNA alkyltransferase (Lindahl & Wood 1999).

Hos *Saccharomyces cerevisiae* forstyrrer mutasjoner i genet RAD52 reaksjonsveien til HR og gir en signifikant økt sensitivitet mot MMS (Krogh & Symington 2004). Sensitiviteten til HR (eller RAD52) mutante celler for MMS, har ført til at dette stoffet i mange år har blitt kalt en "ioniseringshermer" eller en "DNA-DSB-agent". Direkte beviser på at MMS fører til DSB kommer fra analyser av kromosomer fra gjær, hvor behandling med lave nivåer av MMS førte

til fragmentering av kromosomene (Choy & Kron 2002). Videre induserer MMS både inter-kromosomale og intra-kromosomale rekombinasjoner (Myung & Kolodner 2003).

DSB indusert for eksempel av røntgenstråling, kjemikalier eller ved replikasjon av SSB og antageligvis ved reparasjon av interstrand krosslinkk er spesielt relevant for homolog rekombinasjon (Hoeijmakers 2001).

DSB blir generert blant annet fra naturlige kilder når replikasjonsgaffelen kommer til blokkeringsskader. Eksempel på slike skader er skader produsert av metabolske biprodukt av cellulær respirasjon (reaktive oksygen forbindelser (ROS)). ROS fører til at gaffelen kollapser. DSB blir også produsert når celler eksponeres for DNA-skadende behandling inkludert ionisert stråling (IR). IR fører direkte og indirekte, via produksjon av ROS, til DSB (Shrivastav, De Haro, & Nickoloff 2008). Kjemiske agenter og UV-lys fører til replikasjonsblokkeringsskader (alkyladukter, pyrimidindimer, og krysslink). Kreftkjemioterapi påvirker blant annet topoisomerase I og fører til skader som blokkerer replikasjonen (Degrassi, Fiore, & Palitti 2004). Redusert DSB-reparasjon eller feilparring, kan resultere i celledød eller i kromosomforandringer inkludert sletting, translokalisering og kromosomfusjon som fremmes gjennom ustabilitet og er kjennemerke for kreftceller (Shrivastav, De Haro, & Nickoloff 2008)

DSB kan også føre til problemer i mitiose, siden intakte kromosomer er en forutsetning for skikkelig kromosomfordeling ved celledeling. Dermed vil disse skadene indusere forskjellige sorter av kromosom avvik, inkludert aneuploidy, tap av heterozygositet og kromosom-translokalisering- hendelser som forbindes med karsinogenese (Hoeijmakers 2001).

Det har blitt rapportert at *APC*-genet er induserbart og at DNA-alkylerende agenter kan fremme dets transkripsjon. Eksempel på slike alkylerende agenter er N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) og metylmethane sulfonat (MMS) (Kundu et al. 2007b, Narayan & Jaiswal 1997).

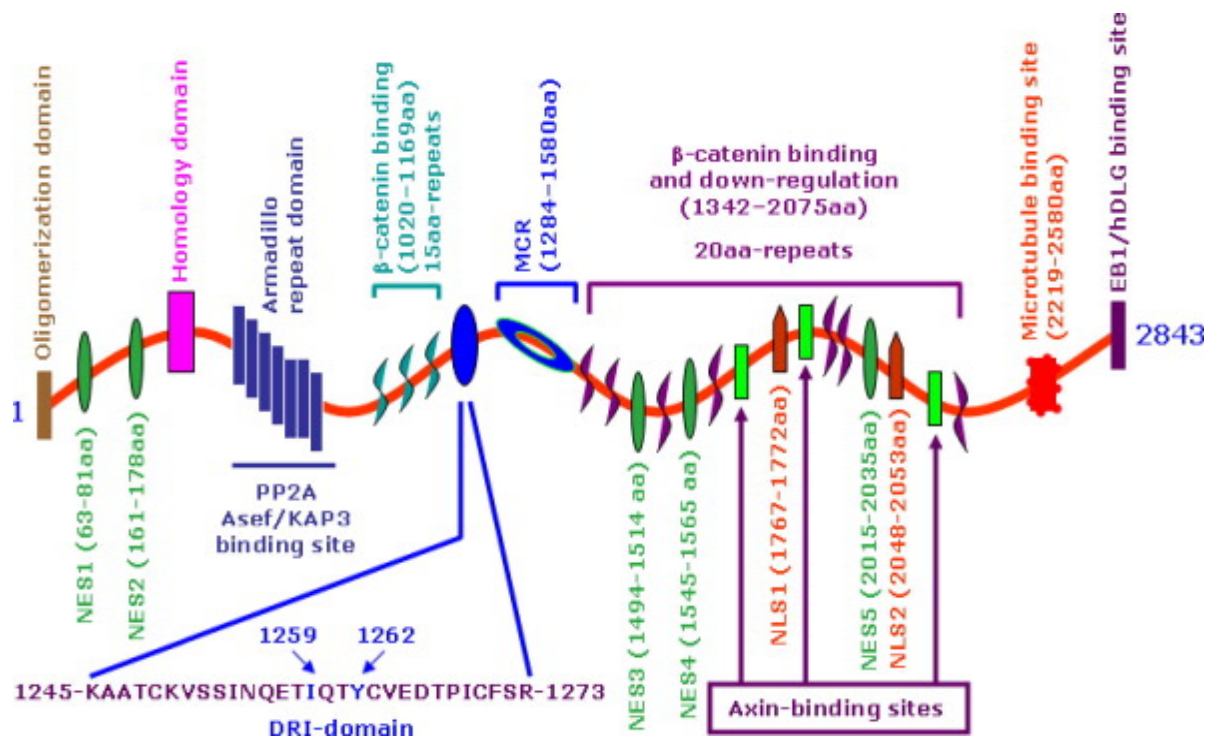
Promotorregionen til *APC*-genet er fullt ut kjent, og inneholder cis-regulerende elementer, en TATA-lignende promotorregion, og p53 bindingselementer i tillegg til en del andre bindingselementer (Jaiswal & Narayan 2001b). Flere studier gjennomført for å klargjøre mekanismen til *APC*-genreguleringen, tyder på at reguleringen i respons til DNA-alkylerende

agenter kan skje ved flere forskjellige mekanismer. I tarmkreft blir transkripsjonsregulering av *APC* induisert av DNA-alkylering, mediert gjennom p53 bindende elementer. Disse funnene var de første som satte en direkte link mellom p53 og *APC* (Jaiswal & Narayan 2001a). Andre mekanismer kan imidlertid ikke utelukkes (Jaiswal & Narayan 2008).

1.1.2 *APC* og reparasjon

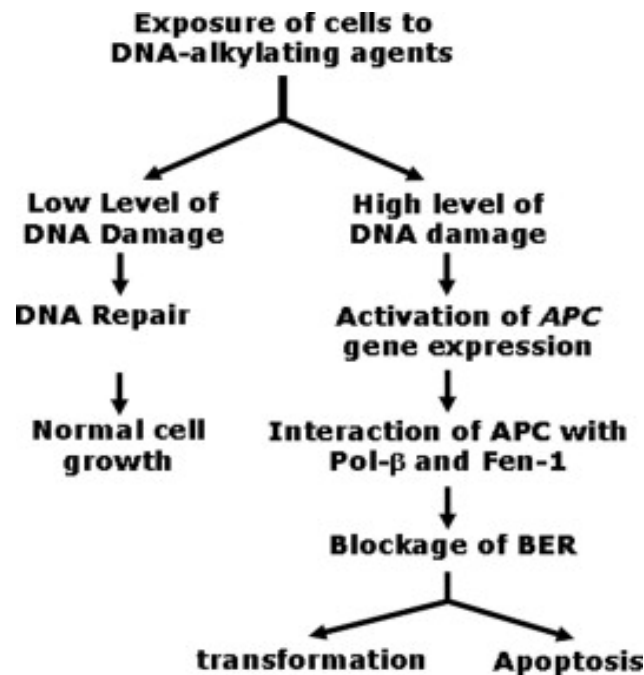
Nyere eksperimenter har vist at *APC* samhandler med BER-proteiner som Pol- β og flap endonuklease 1 (Fen-1), som er de to nøkkelenzymene i reaksjonsveien til BER (Balusu et al. 2007, Jaiswal et al. 2006). I celler fra pattedyr har det vist seg at BER også kan gå gjennom minst to reaksjonsveier ”Singel nuklotid (SN)- BER” og multiplenuklotid eller ”long- patch (LP)- BER” reaksjonsveien. Disse reaksjonsveiene skilles av størrelsen på stedet som skal repareres og ved deltagelse av forskjellige proteiner (Klungland & Lindahl 1997). Det har vist seg at *APC* blokkerer både aktiviteten til DNA-polymerase β (β - Pol) og flap- endonuclease (Fen-1) og dermed blokkerer (LP)-BER (Balusu et al. 2007). Hvilken betydning dette har for cellers reparasjon er imidlertid uklar.

Om *APC*-mediert blokkering av SN- og LP-BER reaksjonsveien har en fysiologisk konsekvens i utviklingen for tarmkreft er ikke undersøkt. DRI-domain på *APC*, som er stedet hvor interaksjonen med Pol- β og Fen-1 finner sted, er lokalisert på N-terminalen og blir spart for mutasjoner av MCR som resulterer i trunkering av proteinet. Dermed er det slik at de fleste muterte *APC*- proteiner (de med et inntakt DRI-domain), så vel som villtype-*APC*, har evne til å modulere BER (figur 2) (Jaiswal & Narayan 2008).



Figur 2: Skjematisk representasjon av strukturen til APC. 2843 aminosyre sekvensen viser et armadillo område nær N-terminalen. Det er to β -katenin bindingsområder. De første 15 aminosyrene kan binde β -katenin, men dens funksjons-signifikans er enda ukjent, mens de 20 repeterte aminosyrene kan binde β -katenin med en høy affinitet mot fosforylering. DRI-domain, er involvert i reguleringen av BER-reaksjonsveien. ASEF, APC-stimulert guanin nuklotid ekchange faktor, DLG, Drosophila discs large; EB1, ende-bindings protein 1, KAP3A, kinesin superfamily-assosiert protein 3A; NES, nukleær eksport signal; NLS, nukleær laokaliseringssignal; PP2-B56 α , protein phosphatase 2A B56 α subenhet (Jaiswal & Narayan 2008).

Tidligere studier har indikert at alkylende DNA-agenter kan fremme nivået av APC i kreftceller fra tarmen. Det induserte nivået av APC kan dermed blokkere SN- og LP-BER aktivitet og påvirke cellulær respons. Avhengig av cellulær kontekst og omfanget av DNA-skadene, kan konsekvensene av APC/ BER-interaksjonene føre til enten økt alkylerings-indusert karsinogenese eller apoptose (Jaiswal & Narayan 2008) (Figur 3).



Figur 3: En hypotetisk modell over rollen til *APC* når det gjelder blokkering av BER i karsinogenese og chemoterapi (Jaiswal & Narayan 2008).

Dette scenariet støttes av studier gjort på effekt av sigaretttrøykkondensasjon, en surrogat for sigaretttrøyk, som induerte *APC*-genuttrykking. Det ble funnet at det økte nivået av *APC* blokkerte LP-BER (Kundu et al. 2007a). På den andre siden, har behandling med MMS ført til økt *APC* nivåer, blokkert BER og til apoptose i humane tarmcellelinjer og museembryo fibroblastceller (Kundu et al. 2007b, Narayan, Jaiswal, & Balusu 2005). Disse resultatene viser at *APC* har en hittil ukjent rolle i celler med skadet DNA (Jaiswal & Narayan 2008).

Nyere data (Kouzmenko et al. 2008) indikerer at *APC* er involvert i DSB reparasjon og at heterozygot trunkeringsmutasjoner forstyrrer den cromatin-assosierte funksjonen til *APC*. Forskning tyder på at *APC* i kjernen samhandler spesielt med transkripsjon og DNA reparasjon av DSB gjennom en region trunkert i de fleste tarmsvulster (Kouzmenko et al. 2008).

Camptothekin (Camp.) er en hemmer av topoisomerase 1 (TOP1) som er et essensielt enzym hos pattedyr. Camp. har rutinemessig blitt brukt i undersøkelser for å studere mekanismer og faktorer som er involvert i kontrollpunktreguleringen av DNA-reparasjon i respons til DSB-

DNA- skade. Camp. fanger det såkalte kløyvde komplekset som dannes mellom topoisomerase 1 og DNA og forhindrer topoisomerase 1-mediert reparasjon av SSB. Når replikasjonsgaffelen til DNA kolliderer med det fanga kløyvbare komplekset, blir SSB omdannet til irreversible DSB (Pommier 2006).

1.2 P53

Tumorsupressorproteinet P53 ble oppdaget i 1979 (Lane & Crawford 1979), og har siden den tid vært et av de mest studerte genene innen humane sykdommer. Hovedgrunnen til dette er at de fleste humane svulster har defekter i reaksjonsveien til p53 (Murray-Zmijewski, Slee, & Lu 2008). I rundt 50 % av humane krefttilfeller inaktiverer genmutasjoner p53. Mutasjonsraten av p53 varierer imidlertid dramatisk fra 10-12 % i leukemi, til 38-70 % i lungekreft og 43-60 % i tarmkreft (Murray-Zmijewski, Slee, & Lu 2008).

Tumorsupressorfunksjonen til p53 kan også bli påvirket ved forhøyet aktivitet av dens hemmere, som MDM2 og MDMX, eller ved redusert aktivitet av dens aktivatorer, som ASPP1 og ATM (Murray-Zmijewski, Slee, & Lu 2008).

P53 fungerer som en transkripsjonsfaktor (TF) og regulerer uttrykkningen av flere målgener. Dette oppnås ved at p53 bindes til den regulatoriske regionen på målgenet (Bose & Ghosh 2007). Målene kan inkludere gener som regulerer stabilitet i genomet, den cellulære responsen til DNA-skader (Kastan et al. 1992), og progresjonen til celledødsprosessen (Michalovitz, Halevy, & Oren 1990). Introduksjon av villtype p53 inn i cellelinjer som har tapt endogent p53-funksjon kan føre til vekststopp (Diller et al. 1990, Mercer et al. 1990) eller indusere en prosess av programmert celledød som kalles apoptose (Shaw et al. 1992).

I tarmkreft blir DNA-alkyleringsindusert transkripsjonsregulering av *APC*-genet mediert gjennom p53 bindende elementer. (Jaiswal & Narayan 2001a).

1.3 Celledød

Cellesyklusmaskineriet merker skader på genomet og stopper opp på spesielle kontrollpunkt i G1, S, G2 og M slik at reparasjon av skader kan finne sted før skadene blir til permanente mutasjoner (Zhou & Elledge 2000). Oppdagelse av skader kan skje ved blokkering av transkripsjonen, replikasjonen eller spesialiserte sensorer. Når skaden blir for signifikant, kan en celle ta det ultimate steget å initiere apoptose (Hoeijmakers 2001).

Celledød kan deles inn i to klasser, apoptose og nekrose. Apoptose brukes synonymt med ”programmert celledød” (Edinger & Thompson 2004). Ved apoptose brytes ikke plasmamembranen ned. I kontrast til apoptose, har nekrose tradisjonelt blitt kalt passiv celledød. Nekrose er resultat av en bioenergetisk katastrofe, som gir mangel på ATP slik at cellen ikke klarer å overleve. Ved nekrose brytes plasmamembranen ned og det cellulære innholdet slippes ut (Edinger & Thompson 2004)

1.4 Cellelinjer med APC-funksjon

I denne oppgaven ble det benyttet humane embryonyreceller (fra Storbritannia), HEK293, som var transfektert med *APC*-gen med tre ulike mutasjoner. Disse mutantene, N750, N1309 og N1807 ble alle uttrykt som Myc-proteiner og kodet for den første 750, 1309 og 1807 aminosyren av *APC*-genet (Tighe, Johnson, & Taylor 2004).

Mutasjonene førte til tre ulike lengder (trunkeringer) på *APC* hvor N750 hadde den korteste formen, N1309 den nest korteste, og N1807 var den celletypen som var nærmest villtype *APC*. HEK 293 celler med fullengde *APC* ble benyttet som kontrollceller. Kvantitative analyser indikerer at N750 ble uttrykt i mengden tilsvarende 20-49 % av det endogene *APC*, mens hos de to andre mutantene ble det transfekterte *APC* bare uttrykt som 10 % av det endogene proteinet (Tighe, Johnson, & Taylor 2004).

På grunn av oppgavens omfang har det på mange av forsøkene bare blitt benyttet kontrollceller og N750, celletypen med det korteste *APC*-genet. N750-cellene ble valgt på grunnlag av MMT-resultatene, hvor de kom ut som de mest følsomme av de trunkerte cellene med hensyn på overlevelse.

Andre celler som er brukt for å studere funksjonen til *APC* er tarmceller fra mus kalt YAMC (Whitehead et al. 1993) (med en villtype *APC*-allel), og IMCE (Whitehead & Joseph 1994) (med en villtype allel og en mutant *APC*^{min}-allel). YAMC/ IMCE modellen har blitt brukt for å vise synergi mellom det enkle *APC*^{min} allelet med enten den onkogene RAS (D'Abaco, Whitehead, & Burgess 1996) eller mutant β -katenin som ikke blir brutt ned (Wagenaar, Crawford, & Matrisian 2001).

I tillegg har den transfekterte humane tarmcellelinjen HT-29 (HT29-*APC* og HT29-GAL) blitt benyttet (Chung et al. 2007). HT-29 cellene har vist seg å ha *APC*-mutasjoner i tillegg til

et mutert p53-gen og et villtype RAS-gen. Transfekteerte HT-29 *APC*-celler inneholder et innduserbart villtype *APC*-gen under promotoren til metallothionin (Chung et al. 2007).

Vi mener at HEK293-celler med mutert *APC* er en bedre modell en tidligere benyttede celler, fordi det er mulig å studere *APC* med ulik lengde.

1.4 Problemstilling

Mutert *APC* kan redusere cellers evne til polymerisering av mikrotubuli. Dette kan ha betydning for reparasjon av DNA-skader, spesielt HR.

I denne masteroppgaven stilles følgende spørsmål:

- Har HEK293-celler med og uten trunkert *APC* ulik overlevelse etter behandling som øker DNA-skader?
- Påvirker trunkert *APC* dannelsen og reparasjon av DNA-skader i HEK293-celler?

2.0 MATERIAL OG METODE

Alle løsninger og kjemikalier er beskrevet i Vedlegg 1 om ikke annet er oppgitt.

2.1 Etablering av cellelinjer

Cellene ble dyrket i 37 °C i 75 cm² plastflasker i Steri-Cycle CO₂ inkubator celleskap (Thermo Electron, USA). Det ble testet to forskjellige plasttyper (fra Sigma Aldrich, Fluka og fra Sarstedt) for å finne ut hvor cellene gror best.

De trunkerte HEK293 N750, N1309 og N1807-cellene fikk alle tilsatt Hygromycin B (4 µl/ml medium). Hygromocyn B ble oppbevart mørkt og kjølig, mediet ble laget på forhånd og satt i celleskapet for å justere pH. Det ble testet om kontrollcellene vokste best med tilsatt Hygromycyn B i mediet ved å tilsette hygromocin b til mediet hos noen kontrollceller og ikke i mediet til andre kontrollceller.

Det ble også testet om HEK293-cellene skulle ha medium med D-MEM med 4, 5 g/l glukose eller 1 g/l glukose på samme måten som hygromicin b ble testet.

Det ble tilsatt ekstra L-Glutamin til en sluttkonsentrasjon på 2 mM i mediet.

Ved trypsinering ble cellene tilsatt trypsin (1 ml /75 cm² flaske) i 2 minutter. Ved nedfrysing ble det fryst ned ca $3 \cdot 10^6$ celler/ ampuller.

Ved utsåing til forsøk ble cellene tilsatt Tetra (0,01 µg/ml) mediet, siden dette induserer trunkeringene.

2.2 Westernmetoden

Western er en metode som ved hjelp av elektroforese separerer proteiner etter størrelse (Towbin, Staehelin, & Gordon 1979). Ved å bruke antistoffer som binder seg spesifikt til de ønskede proteinene, kan man sammenligne mengder av disse proteinene som blir kjørt på samme gel.

2.2.1 Bearbeide celler til western

To like prøvesett ble benyttet på westernforsøkene. Når det gjelder APC ble det benyttet tre ulike prøvesett.

Til western ble det benyttet 10 cm i diameter skåler. I første forsøk hvor bare APC ble målt, ble cellene sådd ut i tettheten $0,5 \cdot 10^5$ /10 ml medium. I forsøk nummer to ble alle celletypene med unntak av N1309 sådd ut i tettheten $0,9 \cdot 10^6$ /10 ml medium, mens N1309 ble sådd ut i tettheten $1, 10 \cdot 10^6$ /10 ml medium I forsøk nummer tre ble alle celletypene med unntak av N1309 sådd ut i tettheten $1 \cdot 10^6$ /10 ml medium, N1309 ble sådd ut i tettheten $1, 10 \cdot 10^6$ /10 ml medium. Cellene ble eksponert med MMS etter følgende oppsett (tabell 2).

Tabell 2: Oversikt over eksponering av westernskåler.

Nr	Behandling*	
	MMS (μ M)	Tetra.
1	-	-
2	-	X
3	300	-
4	300	X
5	600	-
6	600	X

* Annet oppsett for det første forsøket med APC.

Medium ble sugd fra skålene og tatt vare på i 15 ml rør. Skålene ble vasket med 4 ml Dulbeccos PBS som ble tatt vare på i samme rør som mediet. Skålene ble deretter skrapet i 50 μ l sampel buffer, hatt i 1, 5 EP-rør og satt på is. Rørene med medium og PBS ble spunnet ned på KS-5200C Kubotasentrifuge (Kubota Corporation, Japan) ved 80g i 2 minutter. Suspensjonen ble så forsiktig sugd av og kastet slik at pelleten var tørrest mulig. Pelleten ble løst i 20 μ l sampel buffer, og overført til røret med celleduspensjonen. Prøvene ble deretter sonikert med sondesonikator i 3x5sek, før de ble kokt i 5 minutter ved 95 °C med ekstra lokk. Det ble tatt ut 10 μ l til protein måling før prøvene ble fryst ved -20 °C.

2.2.2 Proteinmåling ved hjelp av acetonefelling

Reagensrør ble merket og tilsatt 50 µl dH₂O i tillegg til 1 µl av hver prøve. Deretter ble det tilsatt 250 µl aceton for å felle ut proteinene og løsningene ble sentrifugert med en Ependorf centrifuge 5417C (Ependorf, Tykland) ved 14 000 rpm i 10 min.

Spektrometeret Lambda 40 UV/VIS Spectrometeret (Perkin- elmer, USA) ble satt på og standardkurven ble laget som beskrevet i Tabell 3, men Protein Assay ble tilsatt først rett før prøvene skulle måles.

Tabell 3: En oversikt over standardkurven

konsentrasjon	H ₂ O	BSA (1,43 µg/ml)	1M NaOH	Bio Rad Protein Assay
1,2 µg/ml	750 µl	0,84 µl	50 µl	200 µl
3,0 µg/ml	750 µl	2,09 µl	50 µl	200 µl
4,7 µg/ml	750 µl	3,29 µl	50 µl	200 µl
6,5 µg/ml	750 µl	4,54 µl	50 µl	200 µl
8,2 µg/ml	750 µl	5,73 µl	50 µl	200 µl
10,0 µg/ml	750 µl	6,99 µl	50 µl	200 µl
Blank	750 µl		50 µl	200 µl

Supernatanten ble helt av prøvene og de ble satt til fordamping i avtrekk. NaOH, 50 µl 1M, ble tilsatt prøvene, vortexet og prøvene ble stående mens standardkurven ble kjørt. Rett før måling ble prøvene vortexet, og tilsatt 750 µl dH₂O og 200 µl Bio Rad Protein Assay før prøvene ble vortexet.

Det var viktig at prøvene ble brukt innen 5 minutter - 1 time etter at Protein Assay ble tilsatt. Og at Protein Assay ikke ble tilsatt prøvene før etter at standard kurven var kjørt. Prøvene ble også vortexet rett før målingene.

Målingene ble gjort ved bruk av programmet Lambda 40 bio ved bølgelengde på 595 nm

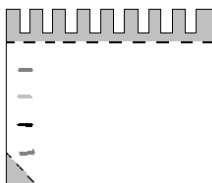
Prøvene ble helt over i engangs plast kuvetter for måling. Først ble begge blankene satt i for å nullstille apparatet. Den ene blanken (innerst) ble stående i apparatet under alle målingene, men maks en time. Det ble laget to nye blanker og trykt på auozero om blankene ble for gammel før alle prøvene var kjørt. Prøvene stabiliserte seg før de ble målt og ble deretter helt

tilbake på røret. Det ble benyttet samme kuvette for parallellene, mens det ble benyttet ny kuvette for de ulike prøvene. For standardkurven ble det benyttet samme kuvette for alle målingene, men de laveste konsentrasjonene ble målt først.

2.2.3 Western kjøring

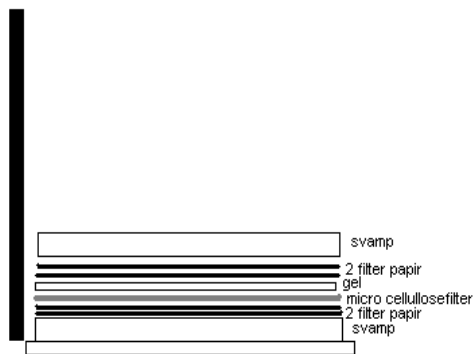
Western gel ble støpt og sto minst en time. Stackinggelen ble deretter støpt og sto også minst en time før polymerisering. Deretter ble elektroforesekaret montert og det ble helt på elektroforesebuffer og brønnene ble skylt med en sprøyte med elektroforesebuffer for å fjerne eventuelle stakingrester. Videre ble det tilsatt en stige på hver gel og prøvene ble applisert i like mengder proteiner og i likt volum (14µl). Etter applisering av prøvene ble elektroforesen kjørt ved 200v til fonten nesten var kjørt ut av gelen.

Gelen ble fjernet fra glassplaten og lagt i blottebuffer i ca 2 minutter pga mulig fasongendring. Hjørnet ble skjært av nederst i hjørnet på stigen for å orientere hvor stigen hadde vært (figur 3).



Figur 3: Risset av en gel.

Alt som ble brukt til blotting ble lagt i blottebuffer for å bli gjennombløtt. Deretter ble gelen lagt inni en sandwich som beskrevet i figur 4. En liten ”kjevle” ble benyttet for å rulle ut luftbobler mellom gelen og nitrocellulosepapiret.



Figur 4: Oversikt over blottingsprosessen

Alt ble lagt inn i et ”blottekammer”¹⁾ som ble satt ned i et kar med blottebuffer og et fryseelement.

Proteinet ble blottet over på nitrocellulosemembran ved 100V i 1 time. ”Sandwitchen” ble åpnet og blottet skåret ut. Blottet ble tørket og fryst før videre behandling eller inkubert i en time i 5% tørrmelk på vippebord ved romtemperatur. Blottet ble deretter inkubert i primærantistoff (1:50 000 fortynning for anti-apc(abi), 1:500 fortynning for p53), fortynnet i 1 % tørrmelk på vippebord ved 4°C over natten. Primærantistoffene benyttet her var anti-apc (Ab1) og p53.

Videre ble blottene vasket med PBS med 0,1 % tween i 3x 10 minutter på vippebord i romtemperatur. Deretter ble blottene behandlet med sekundærantistoff (1:5000) fortynnet i 1 % tørrmelk, på vippebord ved romtemperatur i en time, før de nok en gang ble vasket med PBS med 0,1% tween i 3x 10 minutter.

Til anti-apc (ab1) ble det benyttet antimus mens til p53 ble det benyttet antikanin sekundærantistoff.

Det ble benyttet Pierce chemoilluminsens fremkallingsløsning for å få frem båndene på blottene. Like mengder løsning 1 og 2. (2 ml av hver) ble blandet og blottene ble innkubert i 3 minutter, ett blott av gangen. Blottene ble så montert mellom plastfilmer/overheadark. Det var da klart for eksponering av film.

Fremkalling av blottene ble utført på mørkerom ved at filmen ble lagt på blottet og eksponert i ønsket tid. Videre ble filmen lagt i fremkallingsvæske i inntil 3 minutter, skylt i vann og deretter i fixvæske i minimum 3 minutter. Tilslutt ble filmene lagt i rennende vann i 3 minutter før de ble hengt opp til tørk.

1) Alt utstyr til westernkjøringen var fra Biorad (Tyskland) om ikke annet er nevnt i Vedlegg I

2.3 MTT-celle Proliferasjon og Viabilitet assay (MTT-assay)

MTT-celle Proliferasjon og Viabilitet assay er en sikker, sensitiv, in vitro assay for måling av celle proliferasjon, eller når metabolske hendelser fører til en reduksjon i cellers levedyktighet. Metoden måler mitokondrieaktiviteten og gir dermed mål for antall levende celler. Tetrazolium salt (gult) spaltes til formazan (blått) ved hjelp av enzymer tilhørende respirasjonsskjeden i mitokondriene som blir målt spektrofotometrisk (TACS™ MTT Assays 2008) (bølgelengde test filter 550 nm, ref.filter 650 nm). Produksjonshastigheten til tetrazolium er proporsjonal med raten av celleproliferasjon.

De fire celletypene ble sådd ut i tettheten $2 \cdot 10^6$ /10 ml medium i 96 brønners MTT- brett En celletype per brett. Tre dager etter utsåing ble mediet skiftet, 100 µl medium per brønn, og de ble eksponert med ulike konsentrasjoner av MMS som vist i tabell 4.

Tabell 4: Oversikt over de forskjellige behandlingene med MMS/DMSO i 96 brønners MTT brett.

Behandling (µM) MMS												
-*	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
B**	U***	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	B
B	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	B
B	100	1000	300	600	800	1000	100	300	600	800	100	B
B	100	1000	300	600	800	1000	100	300	600	800	100	B
B	100	1000	300	600	800	1000	100	300	600	800	100	B
B	100	1000	300	600	800	1000	100	300	600	800	100	B
B	100	1000	300	600	800	1000	100	300	600	800	100	B
B	100	1000	300	600	800	1000	100	300	600	800	100	B

* +/- Tetra.

** Brønner uten celler, men tilsatt medium, MTT og SDS.

*** U= Ubehandlet. Disse ble bare tilsatt 5 µl DMSO og teracyklin.

De ubehandlede cellene ble bare tilsatt DMSO og Tetra.. Før eksponeringen ble MMS og DMSO fordelt i tomme 96-brønners MTT- brett (uten celler) i riktige konsentrasjoner. Ved hjelp av multipipette ble det overført 5 µl MMS/DMSO til MTT-brettet med utsådde celler. Halve brettet ble tilsatt Tetra. (0,01µl /ml medium).

Etter eksponering i 24 timer ved 37 °C ble de tilsatt 20 µl MTT (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) /brønn og inkubert i 37 °C 4 timer, før de blir tilsatt 100 µl SDS for å stoppe reaksjonen. Brettene ble inkubert over natten ved 37 °C og lest av i Plateleser (Dynatech laboratories, USA). Programmet Dunex Technologies Revelation (versjon 4.22) ble benyttet.

Gjennomsnittet av de to blanke bakgrunnsverdiene per rekke ble trukket fra og en gjennomsnittlig prosent av de ubehandla med og uten Tetra. ble beregnet. Deretter ble det beregnet prosentvis overlevelse i forhold til det gjennomsnittlige tallet for de ubehandla cellene.

2.4 Alkalisk enkeltcelle gel- elektroforese (Komet) assay

Komet assay (Kometmetoden) er en grei og effektiv teknikk for å måle DNA-skader i eukariote celler (Olive et al. 1992). På den internasjonale Workshopen for genotoksisitetstest (IWGTP) (Washington, DC i 1999), kom et ekspertpanel frem til at den optimale versjonen av Komet assay er den alkaliske (pH> 13) versjonen av assayet som var utviklet av Singh et al. (1988) (Tice et al. 2000). Denne versjonen av assayet har evnen til å oppdage DNA enkelt trådbrudd (SSB) alkaliske labile seter (ALS), DNA-DNA/DNA protein kryss-binding og DSB. Alkalisk Komet assay ble benyttet i denne oppgaven (Tice et al. 2000).

2.4.1 Utsåing og eksponering

Hvis ikke annet er beskrevet ble det benyttet 10 cm i diameter skåler (Sarstet, Tyskland) og cellen ble tilsatt Tetra. (0,01 µl/ml medium) i alle forsøkene. Ved hver av kometforsøkene var det kontroller som ikke ble eksponerte. Disse omtales som ubehandla slik at de ikke blandes med kontrollcellene. De ubehandla cellene ble tilsatt DMSO, lik den høyeste konsentrasjonen som ble tilsatt av MMS eller Camp. De ble også tilsatt Tetra. (0,01µl /ml medium). De ubehandla for røtgenstrålingen ble ikke tilsatt annet enn medium og Tetra. (0,01µl /ml medium).

2.4.1.1 Høsting av celler

Det ble testet om trypsinering eller skraping av skålene ved høsting av cellene gir minst bakgrunnsskader. HEK293 kontrollceller ble sådd ut i tettheten $1,25 \cdot 10^6$ /10 ml medium, mens N1309 ble sådd ut i tettheten $1,5 \cdot 10^6$ / 10 ml medium.

2.4.1.2 Vasking etter trypsinering

Det ble også testet om bakgrunnsskadene ville bli redusert ved å spinne ned cellene og suge av mediet med trypsinen, for deretter å vaske med Dulbeco PBS og tilsette nytt medium.

HEK293 kontrollceller og N750-celler ble sådd ut i tettheten $0,75 \cdot 10^6$ / 10 ml medium.

2.4.1.3 Dose responskurve

HEK293 kontrollceller og N750-celler ble sådd ut i tettheten $1 \cdot 10^6$ / 10 ml medium, mens N1309 og N1807 ble sådd ut i tettheten $1,25 \cdot 10^6$ / 10 ml medium. Deretter ble cellene eksponert med tre forskjellige doser med MMS, 100 μ M, 300 μ M og 600 μ M i 24 timer ved 37°C.

2.4.1.4 Tidskurve

HEK293 kontrollceller og N750-celler ble sådd ut i tettheten $1 \cdot 10^6$, mens N1309 og N1807 ble sådd ut i tettheten $1,25 \cdot 10^6$ / 10 ml medium. Deretter ble cellene eksponert med 300 μ M MMS i forskjellige tider, ½, 1, 2, 4, 8, 12, 24 og 36 time(r), ved 37°C.

2.4.1.5 Camptothecin

HEK293 kontrollceller og N750-cellene ble sådd ut i tettheten $1,5 \cdot 10^6$ / 10 ml medium og $1,32 \cdot 10^6$ / 10 ml medium i det ene forsøket på grunn av lite celler. Deretter ble cellene eksponert med 600 μ M MMS i 15 minutter ved 37°C. Mediet ble deretter sugd av skålene og det ble tilsatt nytt medium samt at noen av skålene ble tilsatt 1 μ M Camp. eller 10 μ M Camp. i 1 time.

2.4.1.6 Stråling

HEK293 kontrollceller ble sådd ut i 3, 5 i diameter skåler i tettheten $0,75 \cdot 10^5$ / 2 ml medium, mens N750- celler ble sådd ut i tettheten $1,4 \cdot 10^6$ / 2 ml medium i det ene forsøket og i tettheten $0,85 \cdot 10^5$ / 2 ml medium i det andre forsøket. Deretter ble cellene bestrålt med røntgenstråling (10 gy). Cellene ble satt på is under hele strålingseksponeringen.

2.4.2 Høsting av celler

Cellene ble høstet ved å vaske med PBS en gang og tilsette trypsin 750 µl i 10 cm i diameter skåler og 150 µl i 3, 5 cm i diameter skåler i 2 minutter for deretter å bli tilsatte medium. Videre ble cellene overført i til 10 ml regensrør. Cellene ble telt i røret med antatt mest celler. Om nødvendig ble celle suspensjonen spunnet ned og medium ble fjernet eller medium ble tilsatt for å tilpasse celletallet til å være ca $1 \cdot 10^6$ / ml. Cellenesuspensjonen (1ml) ble tatt over i 1, 5 ml reagensrør.

2.4.3 Laging av løsninger

Lav smelte agarose (0,75 %) ble laget, samt lyseringsløsningen og elektroforeseløsningen. Agarosen ble oppbevart i 37 °C, og lyserings og elektroforesebufferen ble oppbevart i 4 °C.

Alle de neste stegene ble utført i dempet belysning.

2.4.4 Støping av agarosegeler m /celler

GelBond® Film ble festet til støpe stativ og satt på et avkjølt støpebrett (med filmen mot støpebrettet). Deretter ble støpetårn lagt oppå filmen.

Ved støping ble cellesuspensjonen blandet med agarose (1:10) og 60 µl av blandingen (celler og agarose) ble støpt i en brønn. Blandingen ble sluppet ut på midten i brønnen og fordelt utover ved forsiktige sirkelbevegelser med pipetten. Denne prosessen ble gjort hurtig. Etter støping ble støpetårnene løftet av (ved å løfte dem rett opp og dra dem forsiktig ut, uten å være borti filmen). Deretter ble filmene plassert i lyseringsbuffer og satt ut på kjølerommet ved 4 °C i 1 time, men den kunne også stå over natten.

2.4.5 Behandling med Formamido pyrimidine glycosylase (FPG)- enzym

Dette ble bare gjort på det siste forsøket (som ble repetert 2 ganger). Ved enzymbehandling med Formamido pyrimidine glycosylase (FPG) ble filmene plassert i collinsbuffer først i 10 minutter, så i ny collinsbuffer i 50 minutter på kjølerommet ved 4 °C.

Deretter ble FPG-ekstrakt tint og tilsatt Enzym reaksjonsbuffer (0,2 mg/ml BSA), som gir en sluttkonsentrasjon på 1 µg/ml. Filmene ble lagt i oppvarmet enzymreaksjonsbuffer med eller uten enzym og plassert i 37 °C i en time.

2.4.6 Unwinding i elektroforesebuffer og elektroforese

Filmene ble tilsatt elektroforesebuffer (pH 13,2) i 4 °C, for unwinding av DNA i 5 minutter, deretter i ny elektroforesebuffer i 35 minutter. Gel-elektroforese ble utført ved 8 °C i 20 minutter ved 20 V og ca 300 mA.

Etter elektroforesen ble filmene skylt i nøytraliseringsbuffer i 2×5 minutter i romtemperatur før de ble vasket i dH₂O i 1 minutt. Ved påfølgende fiksering ble filmene først skylt hurtig i etanolbad, og deretter i > 70 % etanol i minst 1, 5 timer for fiksering av filmene.

2.4.5 Avlesning av filmene

Ved avlesning av filmene ble de farget med 20 µl SYBR[®] Gold, som bindes til DNA og avgir fluorescence, og 25 ml TE per film og plassert på vippebord i 20 minutter. Deretter ble filmene skylt i destillert vann i 1 minutt før de ble tørket og oppbevart (maks 3 dager), fuktig, mørkt og kjølig (8° C) når de ikke ble avlest. Etter avlesning ble filmene tørket og lagret i romtemperatur.

Ved avlesning av filmene ble programvaren ”Comet assay IV” fra Perceptive Instruments benyttet. Mikroskopet som ble brukt var Olympus BX51 (Japan) med en A312f Camera (Basler Vivision Technologies, Tyskland), og Olympus Brenner med en Mercury Short-Arc HBO[®] 100 w/2 lampe (Osram, Tyskland). Kometene ble lest av med 20X forstørrelse. De ble valgt ut ved tilfeldig utvalg manuelt, og systemet kalkulerte den totale intensiteten, prosent DNA i hode, prosent DNA i halen og hale moment for hver Komet.

Systemet måler halen fra midten av hodet, og estimerer prosenthaleintensitet relativt til hodet. Systemet skulle gå automatisk, men dersom systemet bommet på midten av hodet ble dette rettet på. Kometer som lå for tett slik at de overlappet ble ikke lest av. Resultatene blir lagt frem som prosent haleintensitet (% DNA i halen) som da blir et mål på DNA-skade.

2.5 Statistikk

Til analyse av dataene ble det ststistikkprogrammet SigmaStat software benyttet. Alle grafene er laget i Mikrosoft excel. Dataene var ikke normalfordelte så two ways anova of variance ble benyttet. All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) ble valgt av programmet. P-verdier på mindre enn 0,05 ble sett på som signifikant. Ved bearbeiding og

fremstilling av resultatene er det tatt utgangspunkt i gjennomsnittsverdi (MEAN) +/- standardavvik til gjennomsnittet (SEM). På grunn av oppgaven omfang ble det bare valgt se på signifikante forskjeller mellom celletypene.

3.0 RESULTAT

3.1 Etablering av cellelinjer

Ved etableringen av en ny cellelinje måtte helt grunnleggende undersøkelser til, som hvilket medium de vokser best i og hvilken plast de fester seg best på. Dette måtte gjøres for at de senere undersøkelsene skulle bli optimale.

Etter uttesting viste det seg at cellene gror best på Sarstedt plast. Det viste seg også at cellene vokste best med 4, 5 g/l glukose i D-MEM i mediet. Cellene ble dyrket i forhåndslaget medium. De trunkerte cellene ble tilsatt Hygromocin B ved dyrking, mens testingen viste at kontrollcellene vokste bedre uten tilsatt Hygromocin B i mediet. Kontrollcellene fikk derfor ikke Hygromycin b tilsatt i sitt medium. Ved utsåing til eksperimentene fikk ingen av celletypene tilsatt Hygromycin b i mediet for at celletypene skulle ha like forhold.

3.2 western

For å undersøke om de trunkerte cellene er tilstede i cellelinjene våre ble det kjørt western med anti-APC. Det ble i tillegg kjørt western med anti-p53 for å undersøke om p53 induserer trunkert APC og om MMS som en alkylerende agent induserer p53.

Ut fra figur 1 og 2 kan vi se at de trunkerte N750, N1309 og N1807- fragmentene av *APC* er tilstede i cellene. Det var vanskelig å få frem N1807- båndet, sammenlignet med N750 og N1309-båndene. Vi klarte ikke å detektere villtype APC på western blottene. Figurene viser også at MMS og Tetra. induserer *APC* (figur 1 og 2). Dette var lettest og se i N750- cellene. Maksimum induksjon av N750-APC ble observert ved eksponering med 300 µM MMS i kombinasjon med Tetra. (Figur 1). Blottene tyder på at det var størst induksjon av N1309 ved denne behandlingen.

Det kan se ut som ut som om kontrollcellene har mindre p53 enn N750-cellen. Figur 1 og 2 viser også at MMS induserer p53 både i kontrollceller og i celler med trunkert *APC*. Den største p53 induseringen hos kontroll og N750-cellen ble observert ved 300 µM MMS i kombinasjon med Tetra., noe som er sammenfallende med maksimum indusering av N750 og N1309 *APC*.



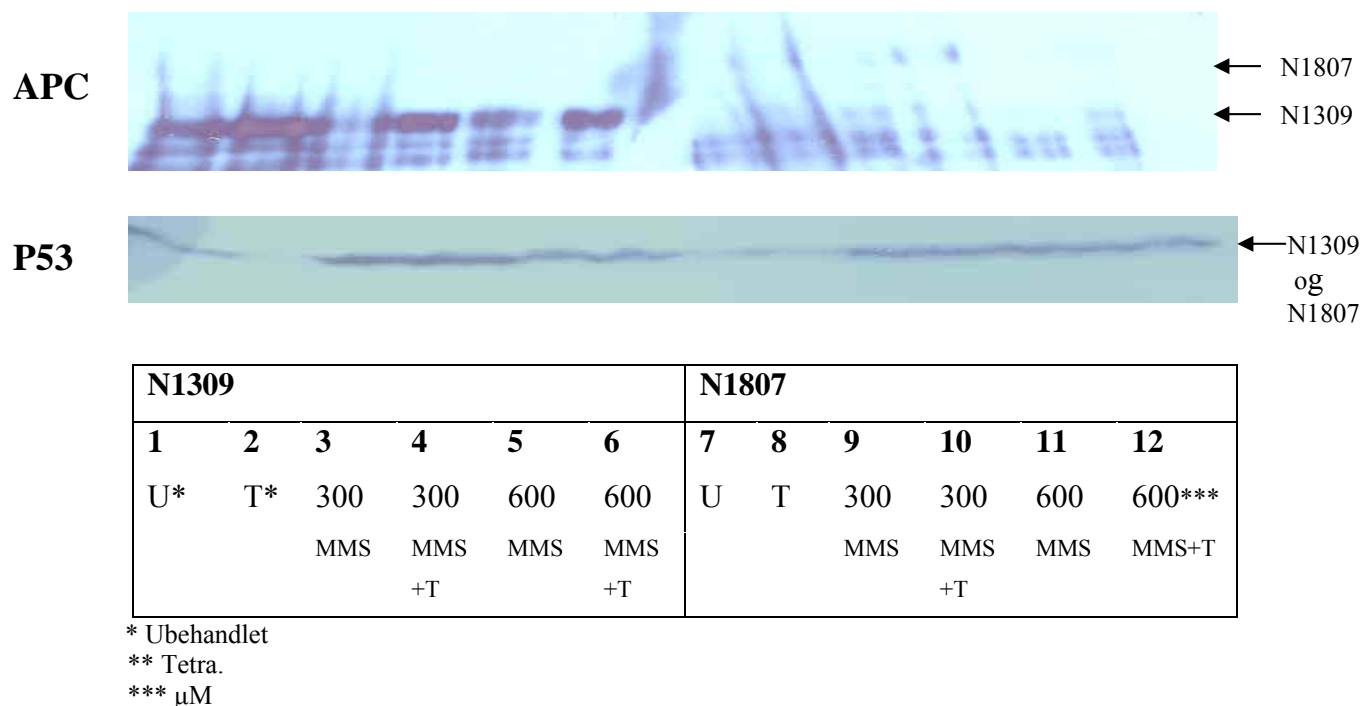
Kontrollceller						N750					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
U*	T**	300	300	600	600	U	T	300	300	600	600***
		MMS	MMS	MMS	MMS			MMS	MMS	MMS	MMS
			+T		+T				+T		+T

* Ubehandlet

** Tetra.

*** μM

Figur 1. Westernblott av kontrollceller og N750-celler behandlet med anti-APC (øverst) og anti-p53 (nederst). Før westernkjøring ble kontrollcellene og N750-cellene behandlet med forskjellige doser med MMS, 300 og 600 μM i 24 timer ved 37 °C. Cellene ble tilsatt Tetra. (0,001 $\mu\text{l/ml}$ medium).



Figur 2. Westernblott av N1309 og N1807-celler behandlet med anti-APC (øverst) og anti-p53 (nederst). Før westernkjøring ble cellene behandlet med forskjellige doser med MMS, 300 og 600 μM i 24 timer ved 37 °C. Cellene ble tilsatt Tetra. (0,001 $\mu\text{l/ml}$ medium).

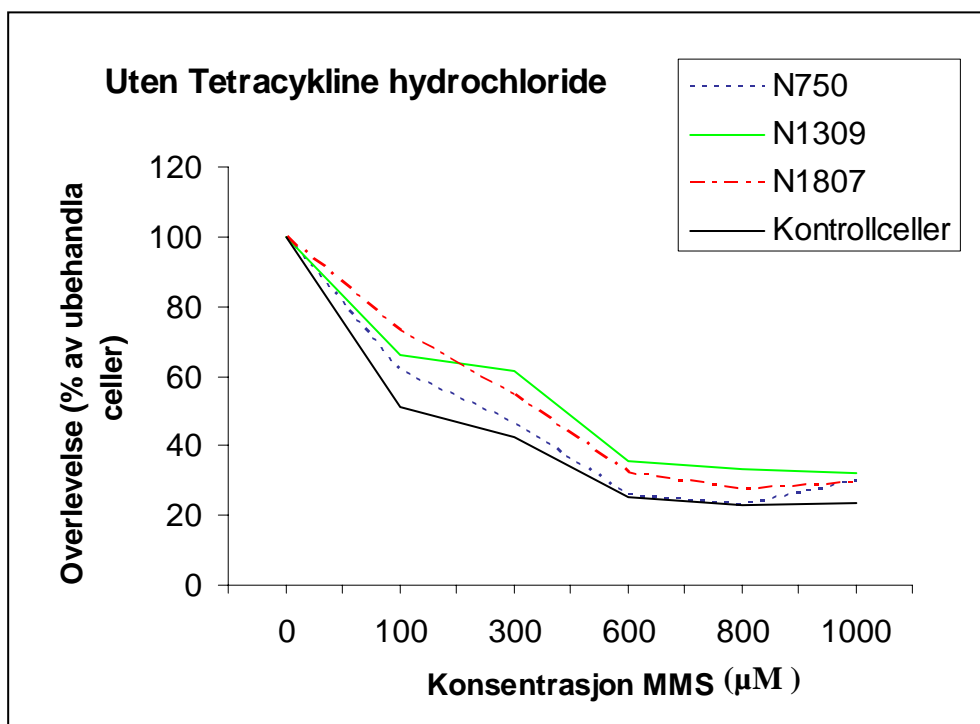
3.3 MTT- assay

3.3.1 Uten Tetra.

For å måle overlevelse av cellene etter DNA skader, deriblant dobbelttråddbrudd, ble cellene behandlet med MMS, og overlevelse ble målt med MTT-assay. Figur 3 viser at for kontrollcellene er det 50 % overlevelse ved en MMS dose på rundt 200 μM , for N750 er det 50 % overlevelse ved en MMS dose på rundt 300 μM , mens for N1309 og N1807 er det 50 % overlevelse ved en dose på ca 450 μM .

Figur 3 viser også en signifikant forskjell for N1807 og kontrollcellene ($p=0,000$) og N1309 og kontrollcellene ($p= 0,006$) ved 100 μM MMS, mens ved 300 μM var det en signifikant forskjell mellom N1309 og kontrollcellene ($p= 0,001$) og N 1309 og N750 ($P=0,007$).

Det ser ut som om kontrollcellene er mest følsomme for MMS behandling, mens N1309-cellene var de minst følsomme.



Figur 3. MTT- assay på HEK293 kontrollcellene, N750, N1309 og N1807- cellene behandlet med 100, 300, 600, 800 og 1000 μM MMS i 24 timer ved 37 °C. Cellene ble ikke tilsatt Tetra..

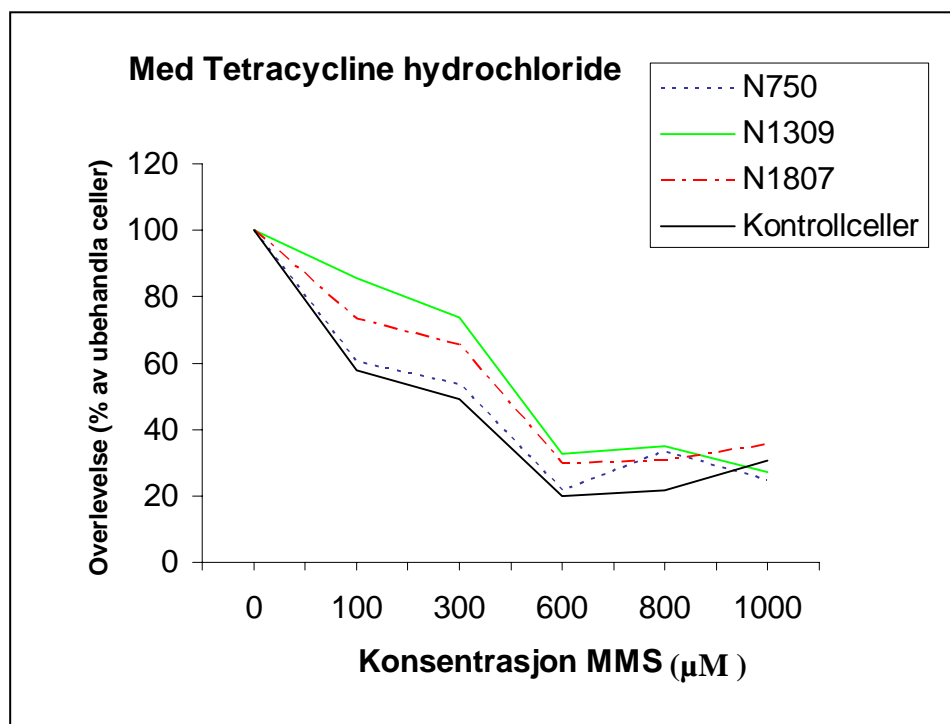
3.3.2 Med Tetra.

Siden Tetra. induserer APC ble det kjørt MTT-assay på cellene tilsatt Tetra. (0,01 μl /ml medium) og samme MMS behandling (figur 4). Resultatene ble litt annerledes enn uten Tetra. Dette tyder på at cellene tåler litt sterkere doser av MMS og det ble målt litt større forskjeller på celletypene.

Figur 4 viser at for kontrollcellene og N750 er det 50 % overlevelse ved en MMS dose på rundt 300 μM, mens for N1309 og N1807 er det 50 % overlevelse ved en dose på ca 500 μM. En signifikant forskjell ble funnet mellom N1309 og kontrollcellene ($p=0,000$), N1309 og N750 ($p=0,000$) og N1807 og kontrollcellene ($p=0,005$) ved 100 μM MMS og de samme,

N1309 og kontrollcellene ($p=0,000$), N1309 og N750 ($p=0,000$), og N1807 og kontrollcellene ($p=0,003$) ved $300\mu\text{M}$ MMS.

Som for MTT uten tilsatt Tetra., ser det ut som om kontrollcellene er mest følsomme for MMS behandling, mens N1309-cellene var de minst følsomme.



Figur 4. MTT-assay på HEK293 kontrollcellene, N750, N1309 og N1807- cellene behandlet med 100, 300, 600, 800 og 1000 μM MMS i 24 timer ved 37 °C. Cellene ble ikke tilsatt Tetra.. Cellene ble tilsatt Tetra. (0,01 μl /ml medium).

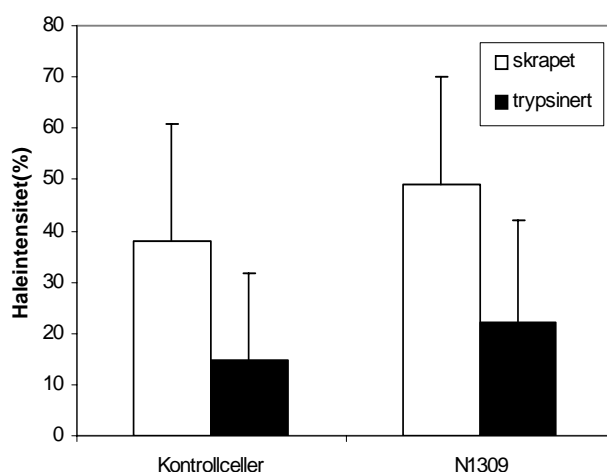
3.4 Kometmetoden

HEK293-cellene har tidligere blitt benyttet til Kometanalyser, og prosedyre beskrevet i litteraturen ble benyttet som utgangspunkt for etablering av metoden (Liu et al. 2003, Wang et al. 2007). De trunkerte HEK293- cellene med trunkert *APC* har ikke tidligere blitt benyttet i Kometmetoden.

3.4.1 Høsting av celler

Før kjøring av Kometmetoden måtte cellene løsnes ved enten trypsinering eller skraping av cellene. Siden ulike celler reagerer ulikt med hensyn på DNA-skader ved skraping og trypsinering måtte dette testes ut ved etablering av Kometmetoden på nye celler (figur 5). Vi ønsket en metode som ville gi en lavest mulig haleintensitet, som er mål på DNA-skade, hos de ubehandlede cellene.

Figur 5 viser DNA-skader til kontrollceller og N1309-cellene etter trypsinering og skraping. Av figuren ser vi at cellene som ble trypsinert har mindre DNA-skader enn de som ble skrapet. Vi valgte derfor å trypsinere cellene etter endt behandling.



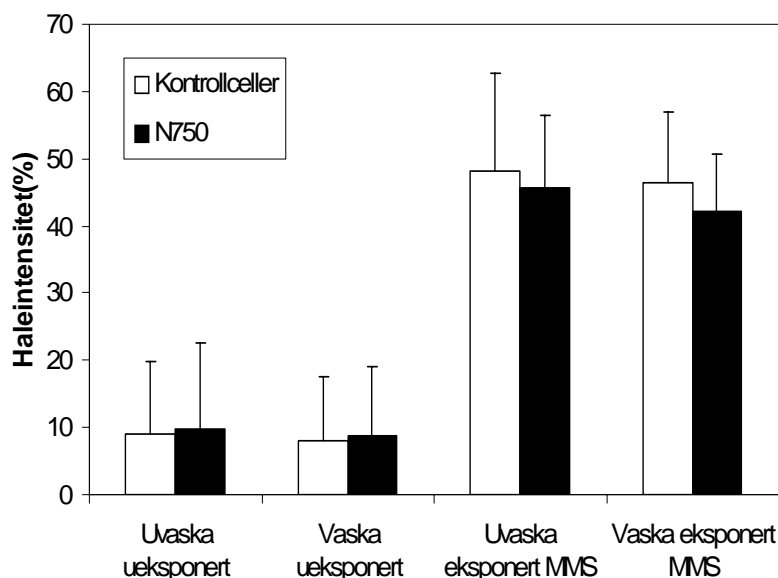
Figur 5. DNA skader i Kometmetoden ved skraping og trypsinering av kontrollcellene og N1309. Dette forsøket ble bare utført en gang.

3.4.2 Vasking etter trypsinering

Vasking av cellene kan i enkelte tilfeller redusere bakgrunnsskader ved bruk av trypsinering for å løsne cellene. Figur 6 viser betydningen av vasking og ikke vasking med Dulbecco PBS etter trypsinering av både ueksponerte kontrollceller og N1309- celler, og celler eksponert med 300 μ M MMS.

Av figur 6 ser vi litt mindre bakgrunnsskader ved vasking med Dulbecco PBS. Det ble likevel valgt å ikke vaske cellene med PBS. Dette pga av små forskjeller, og fordi nøyaktig måling av

DNA-skader forutsetter måling snarest mulig etter trypsinering. I motsatt tilfelle ville risikoen for at cellene fikk tid til å reparere skadene før støping øke.



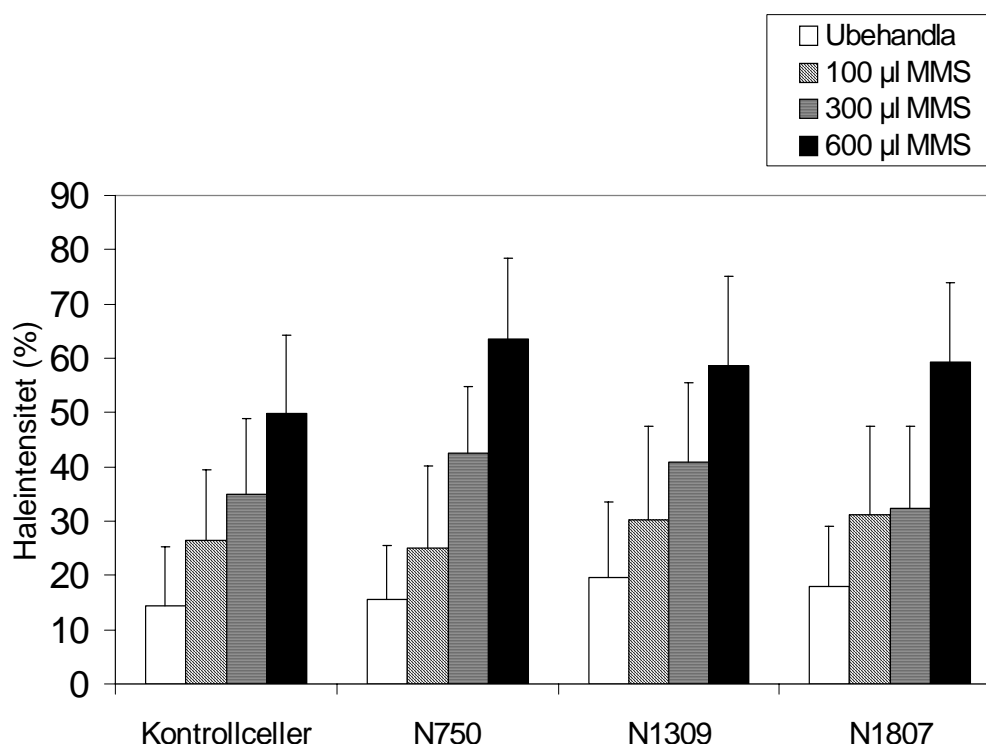
Figur 6. Kometmetoden på HEK293 kontrollcellene og N750-cellene med og uten vasking med PBS etter trypsinering. Cellene var ueksponert og eksponert med 300 μ M MMS i 24 timer ved 37° C. Cellene ble tilsatt Tetra. (0,01 μ l /ml medium). Dette forsøket ble utført en gang.

3.4.3 Dose responskurve

For å danne oss et bilde av graden av DNA-skader og sammenheng med MMS-dosen ble det kjørt en dose responskurve med tre doser med MMS, 100, 300 og 600 μ M (figur 7).

Av figuren kan vi se at den høyeste dosen, 600 μ M MMS gir høye DNA-skader, rundt 50% hos kontrollceller, litt over 60% hos N750, og rundt 60 % hos N1309 og N1807. Dette forsøket ble bare utført en gang, men forsøket indikerer en mulig forskjell på cellene. Det ser ut til at N750 har høyere haleintensitet for både 300 og 600 μ M MMS i forhold til de andre celletypene.

Dette er i kontrast til forsøkene på overlevelse med MTT hvor 1309 ble vist å være de minst sensitive cellene og kontrollcellene de mest sensitive. I tillegg til kontrollcellene ble N750-cellene valgt for videre forsøk med Kometmetoden.



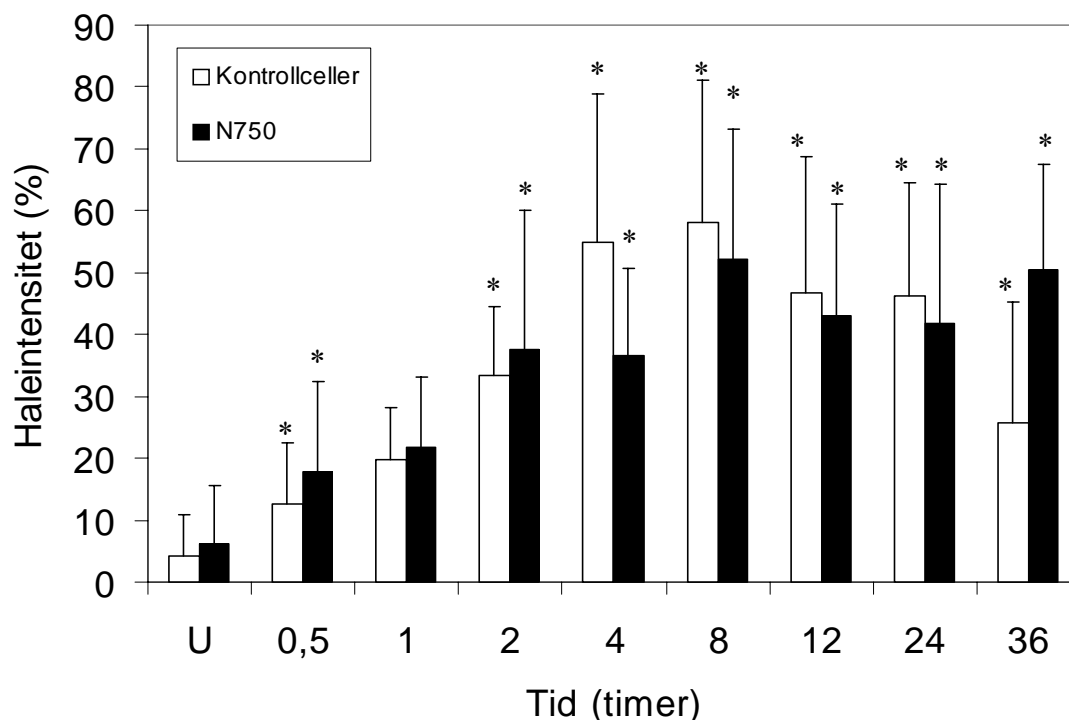
Figur 7. Dose respons kurve for Kometmetoden på HEK293 kontrollcellene, N750, N1309 og N1807. Cellene ble eksponert med tre forskjellige doser med MMS, 100, 300 og 600 μM i 24 timer ved 37 °C. Cellene ble tilsatt Tetra. (0,01 μl /ml medium). Dette forsøket ble utført en gang.

3.4.4 Tidskurve

Det ble kjørt en tidskurve på kontrollcellene og N750- cellene hvor de ble eksponert med 300 μM MMS før cellene ble inkubert i forskjellige tidspunkt (figur 8). Dette ble gjort siden tid og konsentrasjon er to viktige parametre for å undersøke hvor man får maksimum effekt og hvor lenge man skal eksponere cellene.

Av figur 8 ser vi at kontrollcellene viste maksimum haleintensitet etter 4- 8 timer etter endt behandling, mens DNA-skadene i N750-cellene ser ut til å dannes noe saktere (8 timer) enn for kontrollcellene. Det er en signifikant forskjell mellom celletypene ved de forskjellige tidspunktene med unntak av de ubehandla og ved eksponering med MMS i 1 time.

Haleintensiteten hos kontrollcellene var signifikant høyere enn hos N750 ved 4 ($p=0,000$), 8 ($p=0,000$), 12 ($p=0,018$) og 24 ($p=0,004$) timer, mens N750- cellene hadde en signifikant høyere haleintensitet enn kontrollcellene ved 0,5 ($p=0,001$), 2 ($p=0,006$) og 36 ($p=0,000$) timer. Det kan tyde på at DNA-skadene dannes raskere hos kontrollcellene, og at de blir raskere fjernet, mens de dannes saktere i N750- cellene og blir saktere reparert.



Figur 8. Tidskurve for Kometmetoden med kontrollcellene og N750-cellene. Cellene ble eksponert med 300 μM MMS. Etter tilsatt MMS ble de inkubert i celleskap ved 37 °C ved forskjellige tidspunkter, 1/2, 1, 2, 4, 8, 12, 24 og 36 timer. Cellene ble tilsatt Tetra. (0,01 μl /ml medium). Forsøket ble repetert 3 ganger.

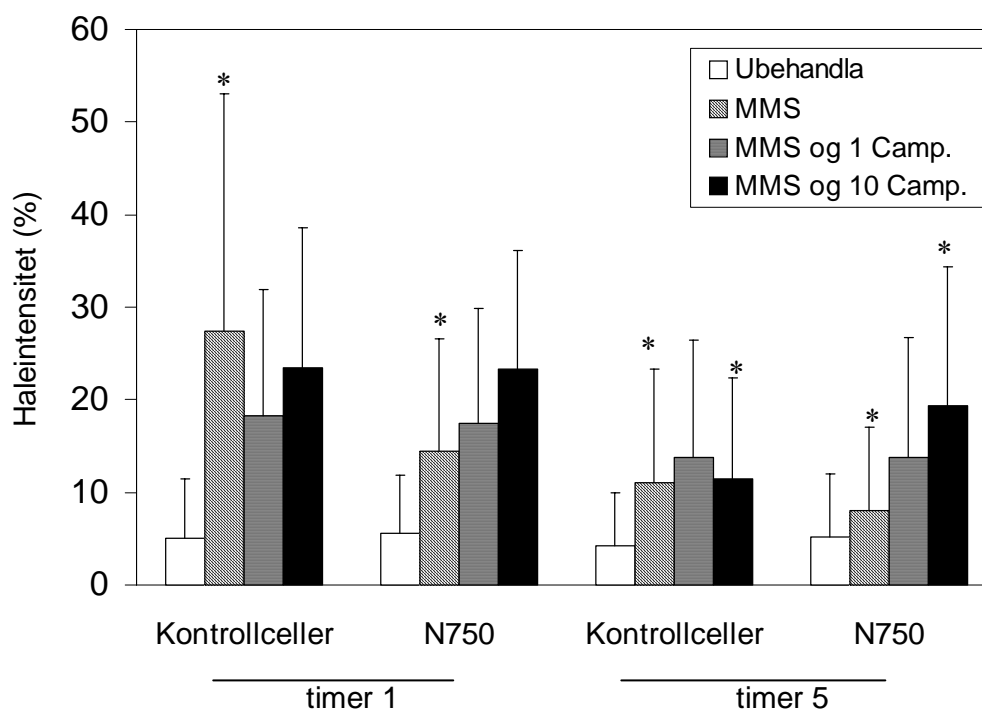
3.4.5 Camptothecin

Camptothecin (Camp.) hemmer topoisomerase 1, og har blitt brukt for å studere mekanismene og faktorer som er involvert i checkpoint regulering og DNA-reparasjon i respons til dobbeltrådd-DNA-skader. Cellene ble eksponert med 600 μM MMS i 15 minutter for å

danne dobbeltråddbrudd, før deler av cellene ble tilsatt to forskjellige doser av Camp. i 1 time. Etter eksponering ble cellene inkubert i celleskap ved 37 °C i 0 og 5 timer (figur 9).

Figur 9 viser at hos cellene som kun ble eksponert med MMS har kontrollcellene flere DNA-skader enn N750-cellene både etter 0 og 5 timer. Ved tilsetning av Camp. (1 eller 10 µM) har cellene likt antall DNA-skader ved 0 timer, mens N750-cellene har høyere antall DNA-skader etter 5 timer. Fra figuren kan vi se at det er litt mer DNA-skader for cellene som ble tatt med en gang etter en time eksponering med Camp. i forhold til de som ble inkubert i 5 timer etter eksponering. Det kan se ut som om Camp. øker antall DNA-skader ved MMS behandling i større grad for N750- cellene enn for kontrollcellene.

Ved eksponering med bare MMS har kontrollcellene signifikant flere DNA-skader enn kontrollcellene etter innkubering i både 0 ($p=0,000$), og 5 ($p=0,006$) timer. Ved 5 timer er det også en signifikant forskjell mellom cellene etter eksponering med MMS og 10 Camp. ($p=0,000$), men da har N750-cellene mer skader enn kontrollcellene.



Figur 9. Kometmetoden på kontrollcellene og N750- cellene eksponert med MMS og Camp. Cellene ble eksponert med 600 μ M MMS i 15 minutter, deretter ble deler av cellene eksponert med 1 μ M eller 10 μ M Comp i 1 time. Noen av cellene ble så inkubert ved 37 °C i 5 timer. Forsøket ble repetert 3 ganger.

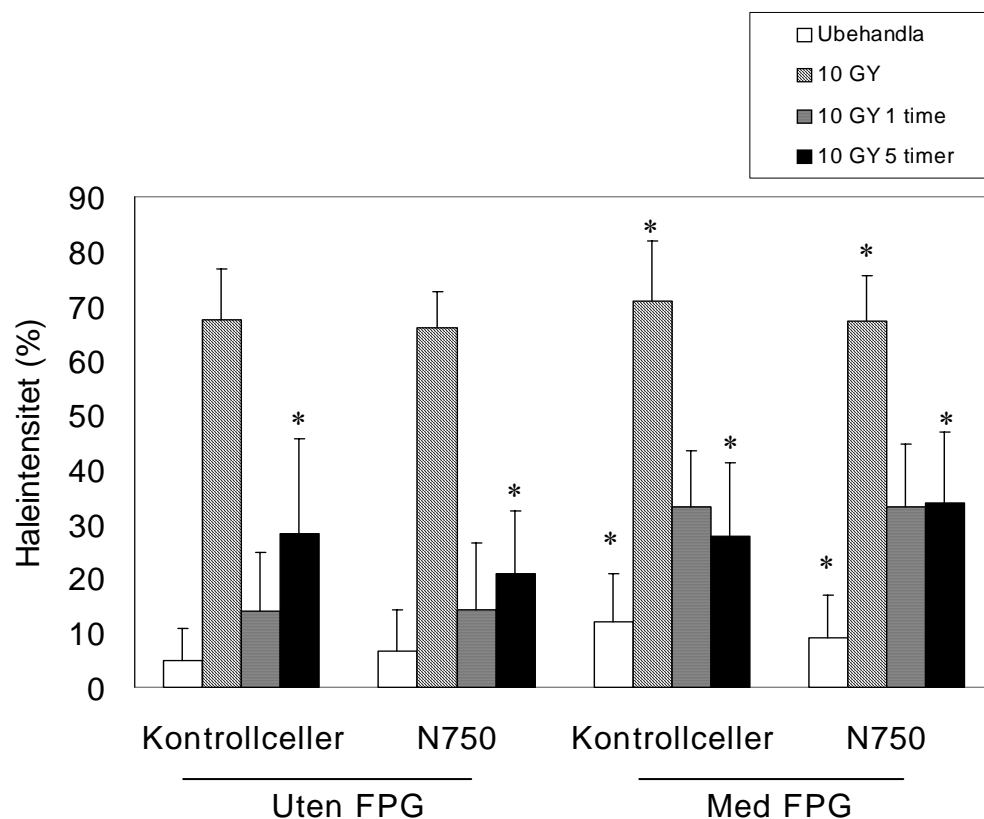
3.4.6 Røntgenstråling og FPG

Det ble også benyttet røntgenstråling (10 Gy) sammen med FPG enzym for å undersøke om de trunkerte N750-cellene reparerer annerledes enn kontrollcellene (figur 10). Røntgenstråling induserer baseskader og enkeltråddbrudd i et 1:1 forhold. I tillegg induseres dobbeltråddbrudd. FPG-proteinet ble brukt for å detektere oksidative DNAbaseskader. FPG detekterer 8-OH guanin og andre oksidative skadede puriner. I tillegg detekterer FPG-alkylerende skader med høy sensitivitet i Kometmetoden.

Figur 10 viser at begge celletypene hadde mest DNA-skader når de ble tatt straks etter bestråling, men behandling med FPG hadde imidlertid ingen effekt på celletypene da. 1 og 5

timer etter bestråling ser vi at det er litt mer DNA-skader med tilsatt FPG-enzym for N750-cellene, mens kontrollcellene bare hadde økt haleintensitet med FPG etter 1 time. Uten FPG hadde både kontrollcellene og N750 høyere haleintensitet 5 timer etter bestråling i forhold til 1 time.

Det ble funnet en signifikant forskjell på celletypene for både med og uten tilsatt FPG for de bestrålte cellene som ble innkubering i 5 timer. Uten FPG viser figuren at kontrollcellene har signifikant mer DNA-skader enn N750-cellene ($p=0,000$), mens med tilsatt FPG enzym er det N750- cellene som har en signifikant høyere haleintensitet enn kontrollcellene ($p=0,000$). I tillegg har kontrollcellene signifikant flere DNA-skader enn N750- cellene ved tilsatt FPG ved 0 timer inkubasjon ($p=0,001$). Det ble også funnet en signifikant forskjell mellom de ubehandlede cellene tilsatt FPG hvor kontrollcellene hadde en signifikant høyere haleintensitet enn N750-cellene ($p=0,011$).



Figur 10. Kometmetoden på kontrollcellene og N750 behandlet med røntgenstråler(10gy). Cellene ble bestrålt med røntgenstråler, 10gy. Etter stråling ble noen av cellene tatt med en gang mens noen ble inkubert i celleskap ved 37 °C i 1 og 5 timer. Halvparten av cellene ble deretter behandlet med enzymet FPG. Dette forsøket ble repetert 2 ganger.

4.0 DISKUSJON

APC har vist seg å være viktig for en normal funksjon av cytoskjelettet. Den bindes direkte til cytoskjelettet (Munemitsu et al. 1994) og indirekte via EB1 (Su et al. 1995), og bidrar også muligens i reguleringen av bevegelsen til aktin via sin interaksjon med Asef, en rac-specific guanine nucleotide "exchange factor" (GEF) (Kawasaki et al. 2000).

Cytoskjelettet er involvert i flere funksjoner i cellene, og mikrotubuli er blant annet viktig for fordeling av kromosomene ved celledeling. Celler som er homozygote for mutasjoner i *APC* viser tydelige forstyrrelse i fordeling av kromosomer, som fører til kromosom ustabilitet (Fodde et al. 2001, Kaplan et al. 2001). Det er imidlertid få mekaniske studier gjort på celler som er heterozygote for *APC*-mutasjoner. I et eksperiment ble det utført en undersøkelse på "multiple intestinal neoplasia (Min)" mus, som har en nedarvet heterozygote mutasjon i *Apc* (Mogensen et al. 2002). Resultatene viste en signifikant reduksjon i antallet mikrotubuli tilstede i forhold til hos kontrollmusene. I samsvar med dette fant også Husøy *et al.* (2003) at et mutert *Apc*-allel hos musecellelinjer førte til en endring av funksjonen til mikrotubuli, med redusert polymeriseringshastighet. Forfatterne mener at mutasjon i et *Apc*-allel er tilstrekkelig for å påvirke funksjonen til mikrotubuli, mens inaktivering av begge villtype-alleler er nødvendig for aktivering av Wnt-signalveien. "(Min)"-mus utvikler spontant mange adenomer i tarmen, og er regnet som en god modell for å studere FAP (Andreassen et al. 2001)

Tighe et al publiserte i 2004 en artikkel hvor de studerte blant annet proliferasjon, overlevelse og kromosom ustabilitet i celler som var transfektert med mutert *APC* (Tighe, Johnson, & Taylor 2004). HEK293 og HCT116 celler ble transfektert med *APC* med tre ulike mutasjoner, N750, N1309 og N1807, noe som resulterte i heterozygot uttrykk av *APC* med ulik lengde i tillegg til normal *APC*. Vi har fortsatt studiene på disse heterozygote HEK293-cellene medtrunkert *APC* som ble laget av Tighe et al.(2004).

Western blott med anti-*APC* ble utført for å være sikker på at cellene fremdeles uttrykker det muterte *APC*-proteinet. Det er vanskelig å kjøre western på *APC* på grunn av størrelsen på proteinet, men vi fikk frem de trunkerte N750, N1309 og N1807-fragmentene av *APC*. Det var enklere å få frem N750-båndene, sammenlignet med N1807 og N1309-båndene. Dette

kan skyldes at N1309 og N1807-proteinene er større enn N750 og dermed vanskeligere å få over på blottet. I tillegg indikerer Tighe, Johnson & Taylor (2004) ved kvantitative analyser at N750 ble uttrykt i mengden tilsvarende 20-49 % av det endogene *APC*, mens hos de to andre mutantene ble det transfekterte *APC* bare uttrykt som 10 % av det endogene proteinet (Tighe, Johnson, & Taylor 2004). Vi klarte ikke å detektere villtype *APC* på western blottene. Dette skyldes at de er enda større og dermed svært vanskeligere å få over på blottet. Det viktigste for oss er imidlertid å påvise de trunkerte *APC*- proteinene, siden det er disse som er transfekterte og det er effekten av disse vi skal studere.

Westernresultatene viser at Tetra. induserer *APC*, noe som er forventet siden det transfekterte *APC*- gen kan induseres av Tetra.. Resultatene viser også at MMS behandling øker produksjon av det transfekterte *APC*-proteinet. At MMS induserer *APC* er også vist tidligere (Kundu et al. 2007b).

Økte DNA- skader som følge av MMS behandling kan føre til induksjon av p53, og p53 er vist å kunne binde til *APC*-promotoren (Jaiswal & Narayan 2001b). Ut fra våre resultater ser det ut som om N750-cellene har mindre p53 enn kontrollcellene i utgangspunktet. Det virker som om MMS induserer p53 og at p53 induserer *APC*. Dette kan føre til at en eksponering med alkylende stoffer fører til produksjon av mer p53 protein som man tror kan resultere i enten økt DNA-reparasjon eller økt apoptose (Shaw et al. 1992).

Tighe, Johnson, & Taylor (2004) viste at celler som uttrykte *APC*- fragmenter i HCT-116 gikk tidligere i mitose når det var spindel toksiner tilstede, konsistent med en defekt i spindel kontrollpunktet. I tillegg viste de at N-*APC* celler viste økt overlevelse etterfulgt av forlenget spindel- skade. Når det gjelder overlevelse ser det ut som om HEK293 kontrollcellene er mest følsomme for MMS behandling, mens HEK293 N1309- cellene var de minst følsomme både med og uten Tetra.. Dermed er disse resultatene konsistent med resultatene til Tighe, Johnson, & Taylor (2004), hvor det også ble målt økt overlevelse hos cellene med trunkert *APC*.

Vi vet ikke om det er nekrose eller apoptose som er den dominerende celledøden for våre celler og hvordan trunkering av cellene påvirker dette. Siden westernresultatene viste at MMS induserer p53, og p53 trolig er med på å bestemme om cellen skal gå i apoptose eller øke reparasjonen (Shaw et al. 1992), kan det tenke seg at det er en økning i apoptose etter eksponering med MMS.

Båndet til kontrollcellene er tydeligere enn båndet til N750- cellene. Det kan derfor se ut til at kontrollcellene har mer p53 enn N750-cellene i utgangspunktet, og med eksponering av MMS. Dette kan bety at kontrollcellene går mer i apoptose enn N750-cellene. Dette stemmer overens med MTT- dataene, hvor kontrollcellene ser ut til å ha lavere overlevelse enn de trunkerte cellene.

Enkelte metoder for DNA- reparasjon er avhengig av et normalt fungerende mikrotubuli, og fordi heterozygot mutasjon i *APC* er vist å endre mikrotubuli- funksjonen tror vi at mutasjon i *APC* også kan redusere DNA- reparasjon.

Tighe et. al. viste at N-*APC* cellene som overlevde ofte inneholdt di-sentriske kromosomer og de ble deretter aneuploide. Disse observasjonene tyder på at trunkerte *APC*-mutasjoner ikke bare forstyrrer tumorsupressor- funksjonen, men også har egenskaper som onkogener. Forfatterne foreslår at initial *APC*-mutasjoner virker som en ”double whammy”, at de destabiliserer genomet og deregulerer poliferasjon før tap av det andre allelet.

I våre forsøk har vi blant annet eksponert cellene med MMS og røntgenstråling som begge kan føre til dannelse av dobbeltråddbrudd (Choy & Kron 2002, Hoeijmakers 2001). Dobbelttråddbrudd repareres hovedsakelig via to mekanismer, nonhomolog end-joining (NHEJ) og homolog rekombinasjon (HR).

DNA dobbeltråddbrudd (DSB) er skader som kan resultere i celledød eller forskjellige genetiske endringer inkludert store og små skala slettinger, tap av heterozygsitet (LOH), translokering og tap av kromosom (Shrivastav, De Haro, & Nickoloff 2008).

De aller fleste svulstene hos Min-mus har tap av *Apc* villtype allel enten ved LOH eller ved tap av hele kromosomet (Andreassen et al. 2001). Dette kan tyde på at heterozygot mutasjon i *Apc* kan føre til en dominant negative effekt på evnen til HR. HR er avhengig av at mikrotubuli fungerer normalt, siden mikrotubuli er med på å posisjonere homologe sekvenser av DNA ved HR. Endringer i mikrotubuli som følge av heterozygote mutasjon i *APC* kan dermed føre til forstyrrelser i HR. Nylig ble det vist at økt DSB stimulerer akkumulering av *APC* til det skadede kromatinet. Dette tyder på at *APC* deltar i reparasjon av DSB, og at mutert *APC* kan svekke denne funksjonen (Kouzmenko et al. 2008).

Selv om man ikke har en god metode for å måle homolog rekombinasjon, valgte vi å prøve å måle DNA-skader og eventuell reparasjon med Kometmetoden.

Siden Kometmetoden ikke var kjørt på de transfekterte HEK293-cellene før, valgte vi å begynne å teste helt grunnleggende ting som høsting av celler. Det viste seg at trypsinering kontra skraping førte til minst bakgrunnskader i DNA. Noe de også har brukt tidligere i Kometmetoden på normale HEK293-celler (Liu et al. 2003). Ved trypsinering varmes cellene opp, noe som fører til økt reparasjon og som dermed kan påvirke forsøkene. Vi synes likevel at det ble såpass mye mindre bakgrunnskader av trypsineringen i forhold til skrapingen at en rask trypsinering ville være det beste. Når det gjelder vasking av cellene etter trypsinering synes vi imidlertid at forskjellen på DNA-skader var såpass små at den ekstra tiden det tar med vasking ikke ville være gunstig med hensyn på at alt skal gå raskt. Dessuten var konsentrasjonen som ble brukt av trypsin såpass liten at fortynnet i mediet vil den trolig ikke ha noe innvirkning på cellene.

MMS-doseresponskurven (figur 7) indikerer at det er en forskjell på cellene, det ser ut til at N750 har litt flere DNA skader enn de andre cellene. Dette forsøket ble imidlertid bare kjørt en gang og vi kan derfor ikke konkludere noe ut fra dette forsøket.

MMS er en DNA-alkylerende agent som har vist seg å danne dobbeltrådbrudd in vivo i *Saccharomyces cerevisiae* (Lundin et al. 2005). MMS har blitt brukt som en erstatning for stråling i studier av gjær i årevis på grunn av at mange av de originale strålingssensitive mutantene viste seg også å være sensitive for MMS (Lundin et al. 2005). Det er kjent at MMS induserer søster kromatid utveksling (SCEs) (Kaina 2004). SCEs er gjensidig utveksling av DNA mellom søster kromatider i S-fasen. Man tror at dette er en begivenhet i HR. De strålingslignende egenskapene og egenskapene til SCE induksjon viser imidlertid ikke om MMS fører direkte til brudd i DNA-trådene, eller om bruddene kommer sekundært etter metylskader eller etter at reparasjonsgaffelen har kollapset.

Det har blitt vist at histon H2AX blir fosforylert (γ H2AX) som følge av MMS eksponering (Pascucci et al. 2005). Det virker å være en aksept for at fosforylering av H2AX er en spesifikk markør for dobbeltrådbrudd, men at den ikke identifiserer den eksakte kilden for trådbruddet (Wyatt & Pittman 2006). Det er sett hurtig fosforylering av histone H2AX i s-fasen til (Pol) β null-museembryonic-fibroblastsceller etter eksponering med MMS. I tillegg

ble det sett relokalisering i kjernen av Rad51 proteinet som er essensielt for HR. Disse funnene støtter opp om en hypotese om at DSB som oppstår etter MMS-eksponering, stammer fra SSB som ikke blir reparert i BER. Disse SSB vil være et substrat for HR (Pascucci et al. 2005). Det er få beviser for at MMS fører direkte til dobbeltråddbrudd, likevel er det tydelig at mellomprodukter i BER trenger HR proteiner. Dette setter søkelyset på at HR også kan være involvert i annen reparasjon enn reparasjon av DSB (Tercero & Diffley 2001).

På tidskurven i Kometforsøket (figur 8) viser kontrollcellene maksimum DNA-skader etter eksponering for 300µM MMS etter 4-8 timer, mens N750-cellene viser maksimum DNA-skader etter eksponering i åtte timer. Dette indikerer at DNA-skadene dannes raskere hos kontrollcellene, og at de blir raskere fjernet, mens de dannes saktere i N750-cellene og blir saktere reparert. Dette stemmer med vår teori om at mutert *APC* kan påvirke reparasjonen, og da muligens DSB siden det tar lang tid å reparere disse.

Det kan også tenkes at blokkering SN-og LP-BER aktivitet er en mekanisme her. Tidligere studier har indikert at alkylende DNA-agenter kan fremme nivået av *APC* i kreftceller fra tarmen og at det induserte nivået av *APC* kan blokkere SN-og LP-BER aktivitet og påvirke cellulær respons (Jaiswal & Narayan 2008). Konsekvensen av dette er avhengig av cellulær kontekst og omfanget av DNA-skadene, men kan føre til enten økt alkylerings-indusert karsinogense eller apoptose. Dette kan stemme med at DNA-skadene er høyere hos N750-cellene enn hos kontrollcellene i starten av tidskurven når man kan tenke seg at det foregår mest reparering av enkeltråddbrudd.

I det ene eksperimentet ble Camptothecin (Camp.) brukt. Camp hemmer topoisomerase 1 og er ofte brukt for å studere mekanismene og faktorer som er involvert i kontrollpunkt regulering og DNA-reparasjon i respons til DSB (Pommier 2006). Resultatet (figur 9) viser at hos cellene som kun ble eksponert med MMS har kontrollcellene signifikant flere DNA-skader enn N750-cellene både etter inkubasjon i 0 og i 5 timer. Dette stemmer overens med forrige figur (figur 8) og med MTT forsøket hvor også kontrollcellene virket å være mer sensitive ovenfor MMS enn N750-cellene. Etter tilsetning av Camp. kan det derimot se ut til DNA skadene øker i større grad for N750-cellene enn for kontrollcellene, med signifikant større DNA skader for N750-cellene enn kontrollcellene etter tilsetning av 10 µM Camp. og inkubasjon i 5 timer ($p=0,000$). Dette kan igjen stemme med vår teori om at mutert *Apc* hemmer reparasjon og at dette forsterkes av Camp.

Ved røntgenstråling (10 Gy) av N750- cellene og kontrollcellene samt eksponering med FPG-enzymet (figur 10) var vi ute etter å undersøke mulige forskjeller i reparasjon. Siden HR-proteiner har vist seg å være viktige for BER ble det valgt å eksponere med FPG-proteinet. FPG ble brukt for å detektere oksidative DNA base skader som 8-OH guanin og andre oksidative skadede puriner. I tillegg detekterer FPG- alkylenderes kader med høy sensitivitet i Kometmetoden (Speit et al. 2004). Figur 10 viser at begge celletypene hadde mest DNA-skader når de ikke ble inkubert etter bestråling. Uten innkubering, men med tilsatt FPG-enzym, hadde kontrollcellene en signifikant høyere haleintensitet enn N750-cellene ($p=0,001$). Det ble funnet en signifikant forskjell på celletypene både med og uten tilsatt FPG for de bestrålte cellene som ble inkubert i 5 timer. Uten FPG viser figuren at kontrollcellene har signifikant mer DNA-skader enn N750-cellene ($p=0,000$), mens med tilsatt FPG- enzym er det N750- cellene som har en signifikant høyere haleintensitet enn kontrollcellene ($p=0,000$). Dette kan igjen tyde på at N750- cellene er dårligere enn kontrollcellene til å reparere.

Siden enkelttrådbrudd repareres hurtig er det viktig å utføre strålingen på is og holde cellene kalde og minimere tiden det tar før lyseringen (som stopper all reparasjon) i Kometmetoden. Den enkleste måten å gjøre dette på er å stråle cellene etter støping i gelen. Cellene sto på is før, under og etter stråling på dette siste forsøket. På de andre forsøkene ble det ikke brukt is. Cellene burde vært satt på is etter trypsinering og dette kan ha påvirket resultatene noe, men siden dette er likt for alle cellene tror vi ikke at is vil endre en eventuell forskjell mellom celletypene, som vi da hovedsakelig var interessert i å undersøke.

Det viste seg at kanskje ikke Kometmetoden er den ideelle metoden for å måle dobbelttrådbrudd i DNA eller reparasjon av disse. Dette kan skyldes at Kometmetoden måler flere typer DNA- skader (ikke bare DSB) og reparasjon måles ikke direkte men kun som en nedgang i DNA- skader. Det er mulig å prøve de to andre metodene som kan brukes for å måle DNA- skader. En tidlig mikroskop- imunocytokjemisk analyse av det endogene APC i kjernen har imidlertid vist seg å være kontroversiell og problematisk (Brocardo, Nathke, & Henderson 2005, Mogensen et al. 2002). Dette ble prøvd på våre celler, men det viste seg å være vanskelig å kvantifisere resultatene. En siste måte å måle DNA skader er ved bruk av histone H2AX. Dette blir også ofte gjort ved immunhistokjemi, noe som også vanskeliggjør kvantitering. Det er mulig at det finnes metoder som kan kvantifisere dette ved hjelp av ELISA. Dette er en mulighet som kan prøves ut senere som et mer direkte mål på HR.

FAP- pasienter utvikler multiple adenomer i tykktamen, mens *Apc*-adenomer hos Min-mus utvikles hovedsakelig i tynntarmen (Colnot et al. 2004). Grunnen til denne forskjellen mellom mennesker og mus er hittil ukjent og nettopp derfor kan undersøkelser med en humancellelinje kanskje gi nærmere svar på dette. Den humane cellelinjen som ble brukt i våre forsøk, HEK293 har både villtype og mutert *APC*-allel og er dermed konsistent med svulster hos FAP- pasienter hvor det ene villtypeallelet er inntakt. Dette er dermed de første cellenelinjene som har villtype *APC*-allel inntakt sammen med mutert *APC*-allel. De har imidlertid et muterte *APC*-allel og to villtypeallel, i forhold til FAP-pasienter som har et villtypeallel og et mutert *APC*-allel. Hvilke forskjeller dette utgjør vet vi ikke, men vi tror likevel at disse cellene er mer nærliggende FAP-pasienters celler enn for eksempel YAMC-celler. Vi synes derfor det er spennende å fortsette videre undersøkelser på disse cellelinjene.

4.1 Konklusjon

- HEK293- celler med normalt *APC* hadde lavere overlevelse enn celler med trunkert *APC* etter behandlet med det DNA skadelige stoffet MMS. Hek293 N750-cellene hadde lavest overlevelse av de trunkerte cellene, mens N1309-cellene hadde den høyeste overlevelsen.
- Kometmetoden viste at HEK293-celler med normalt *APC* fikk en raskere økning i dannelse av DNA skader med MMS og strålebehandling enn N750-cellene med trunkert *APC*. Kometforsøkene tyder på at N750-cellene reparerer DNA-skadene noe langsommere enn HEK293-cellene med normalt *APC*. Dette underbygges med høyere antall DNA-skader i de trunkerte N750-cellene over tid, og en større økning i DNA-skader ved behandling med Camp. Dette kan skyldes redusert reparasjon av DSB.

4.2 Videre arbeid

Kometmetoden måler flere typer DNA-skader (ikke bare DSB) og reparasjon måles ikke direkte men kun som en nedgang i DNA-skader. En metode som målte DNA-reparasjon av DBS direkte ville vært ønskelig

Videre vil det være interessant å prøve å måle H2AX for å se om det er en bedre metode enn Kometmetoden for å måle DSB DNA-skader på våre celler. Per i dag finnes ikke denne metoden lett tilgjengelig. I tillegg vil det være interessant å måle apoptose ved flow og analysere cellesyklusen.

5. Referanseliste

Andreassen, A., Vikse, R., Steffensen, I. L., Paulsen, J. E., & Alexander, J. 2001, "Intestinal tumours induced by the food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in multiple intestinal neoplasia mice have truncation mutations as well as loss of the wild-type Apc(+) allele", *Mutagenesis*, vol. 16, no. 4, pp. 309-315.

Balusu, R., Jaiswal, A. S., Armas, M. L., Kundu, C. N., Bloom, L. B., & Narayan, S. 2007, "Structure/function analysis of the interaction of adenomatous polyposis coli with DNA polymerase beta and its implications for base excision repair", *Biochemistry*, vol. 46, no. 49, pp. 13961-13974.

Beinhauer, J. D., Hagan, I. M., Hegemann, J. H., & Fleig, U. 1997, "Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form", *J Cell Biol.*, vol. 139, no. 3, pp. 717-728.

Beranek, D. T. 1990, "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents", *Mutat.Res.*, vol. 231, no. 1, pp. 11-30.

Bezzubova, O., Silbergleit, A., Yamaguchi-Iwai, Y., Takeda, S., & Buerstedde, J. M. 1997, "Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54^{-/-} mutant of the chicken DT40 cell line", *Cell*, vol. 89, no. 2, pp. 185-193.

Bienz, M. & Clevers, H. 2000, "Linking colorectal cancer to Wnt signaling", *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 311-320.

Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Rykala, J., Kolacinska, A., Morawiec, Z., Drzewoski, J., & Zadrozny, M. 2004, "Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer", *Mutat.Res.*, vol. 554, no. 1-2, pp. 139-148.

Bose, I. & Ghosh, B. 2007, "The p53-MDM2 network: from oscillations to apoptosis", *J Biosci.*, vol. 32, no. 5, pp. 991-997.

Brocardo, M., Nathke, I. S., & Henderson, B. R. 2005, "Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies", *EMBO Rep.*, vol. 6, no. 2, pp. 184-190.

Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. 1998, "Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers", *Nature*, vol. 392, no. 6673, pp. 300-303.

Cheeseman, I. M., Drubin, D. G., & Barnes, G. 2002, "Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast", *J Cell Biol.*, vol. 157, no. 2, pp. 199-203.

Choy, J. S. & Kron, S. J. 2002, "NuA4 subunit Yng2 function in intra-S-phase DNA damage response", *Mol.Cell Biol.*, vol. 22, no. 23, pp. 8215-8225.

Chung, C. S., Jiang, Y., Cheng, D., & Birt, D. F. 2007, "Impact of adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human colon cancer cell lines on cell cycle arrest by apigenin", *Mol.Carcinog.*, vol. 46, no. 9, pp. 773-782.

Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le, P. S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., & Perret, C. 2004, "Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers", *Lab Invest*, vol. 84, no. 12, pp. 1619-1630.

Constancio-Lund, S. S., Brabek, J., & Hanks, S. K. 2008, "Src transformation of colonic epithelial cells: Enhanced anchorage-independent growth in an Apc(+/-) background", *Mol.Carcinog.*

D'Abaco, G. M., Whitehead, R. H., & Burgess, A. W. 1996, "Synergy between Apc min and an activated ras mutation is sufficient to induce colon carcinomas", *Mol.Cell Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 884-891.

Degrassi, F., Fiore, M., & Palitti, F. 2004, "Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs", *Curr Med Chem.Anticancer Agents*, vol. 4, no. 4, pp. 317-325.

Diller, L., Kassel, J., Nelson, C. E., Gryka, M. A., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S. J., Vogelstein, B., & . 1990, "p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas", *Mol.Cell Biol.*, vol. 10, no. 11, pp. 5772-5781.

Dronkert, M. L., Beverloo, H. B., Johnson, R. D., Hoeijmakers, J. H., Jasin, M., & Kanaar, R. 2000, "Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange", *Mol.Cell Biol.*, vol. 20, no. 9, pp. 3147-3156.

Edinger, A. L. & Thompson, C. B. 2004, "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy", *Curr Opin Cell Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 663-669.

Essers, J., Hendriks, R. W., Swagemakers, S. M., Troelstra, C., de, W. J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., & Kanaar, R. 1997, "Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination", *Cell*, vol. 89, no. 2, pp. 195-204.

Fearnhead, N. S., Britton, M. P., & Bodmer, W. F. 2001, "The ABC of APC", *Hum.Mol.Genet.*, vol. 10, no. 7, pp. 721-733.

Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H., & Clevers, H. 2001, "Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability", *Nat.Cell Biol.*, vol. 3, no. 4, pp. 433-438.

Fodde, R., Smits, R., & Clevers, H. 2001, "APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer", *Nat.Rev Cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 55-67.

Gaivao, I., Piasek, A., Brevik, A., Shaposhnikov, S., & Collins, A. R. 2007, "Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation", *Cell Biol.Toxicol.*

Green, R. A. & Kaplan, K. B. 2003, "Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC", *J Cell Biol.*, vol. 163, no. 5, pp. 949-961.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., & . 1991, "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene", *Cell*, vol. 66, no. 3, pp. 589-600.

Helse Bergren (2005) <http://www.helse-bergen.no/avd/medgen/diagnose/tarmkreft.htm> [Lastet ned 9.10.2008].

Hoeijmakers, J. H. 2001, "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer", *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 366-374.

Hunter, T. 1997, "Oncoprotein networks", *Cell*, vol. 88, no. 3, pp. 333-346.

Husøy, T., Cruciani, V., Knutsen, H. K., Mikalsen, S. O., Olstorn, H. B., & Alexander, J. 2003, "Cells heterozygous for the ApcMin mutation have decreased gap junctional intercellular communication and connexin43 level, and reduced microtubule polymerization", *Carcinogenesis*, vol. 24, no. 4, pp. 643-650.

Jaiswal, A. S., Balusu, R., Armas, M. L., Kundu, C. N., & Narayan, S. 2006, "Mechanism of adenomatous polyposis coli (APC)-mediated blockage of long-patch base excision repair", *Biochemistry*, vol. 45, no. 51, pp. 15903-15914.

Jaiswal, A. S. & Narayan, S. 2001a, "p53-dependent transcriptional regulation of the APC promoter in colon cancer cells treated with DNA alkylating agents", *J Biol.Chem.*, vol. 276, no. 21, pp. 18193-18199.

Jaiswal, A. S. & Narayan, S. 2001b, "Upstream stimulating factor-1 (USF1) and USF2 bind to and activate the promoter of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene", *J Cell Biochem.*, vol. 81, no. 2, pp. 262-277.

Jaiswal, A. S. & Narayan, S. 2008, "A novel function of adenomatous polyposis coli (APC) in regulating DNA repair", *Cancer Lett.*, vol. 271, no. 2, pp. 272-280.

Juwana, J. P., Henderikx, P., Mischo, A., Wadle, A., Fadle, N., Gerlach, K., Arends, J. W., Hoogenboom, H., Pfreundschuh, M., & Renner, C. 1999, "EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins", *Int.J Cancer*, vol. 81, no. 2, pp. 275-284.

Kaina, B. 2004, "Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go", *Cytogenet.Genome Res.*, vol. 104, no. 1-4, pp. 77-86.

Kaplan, K. B., Burds, A. A., Swedlow, J. R., Bekir, S. S., Sorger, P. K., & Nathke, I. S. 2001, "A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation", *Nat.Cell Biol.*, vol. 3, no. 4, pp. 429-432.

Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., & Fornace, A. J., Jr. 1992, "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia", *Cell*, vol. 71, no. 4, pp. 587-597.

- Kawasaki, Y., Sato, R., & Akiyama, T. 2003, "Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells", *Nat.Cell Biol.*, vol. 5, no. 3, pp. 211-215.
- Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O., & Akiyama, T. 2000b, "Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling", *Science*, vol. 289, no. 5482, pp. 1194-1197.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., McKechnie, D., & . 1991, "Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21", *Science*, vol. 253, no. 5020, pp. 661-665.
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1996, "Lessons from hereditary colorectal cancer", *Cell*, vol. 87, no. 2, pp. 159-170.
- Klungland, A. & Lindahl, T. 1997, "Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1)", *EMBO J*, vol. 16, no. 11, pp. 3341-3348.
- Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Kawasaki, Y., Akiyama, T., & Kato, S. 2008, "Truncation mutations abolish chromatin-associated activities of adenomatous polyposis coli", *Oncogene*, vol. 27, no. 36, pp. 4888-4899.
- Krishna, S., Wagener, B. M., Liu, H. P., Lo, Y. C., Sterk, R., Petrini, J. H., & Nickoloff, J. A. 2007, "Mre11 and Ku regulation of double-strand break repair by gene conversion and break-induced replication", *DNA Repair (Amst)*, vol. 6, no. 6, pp. 797-808.
- Krogh, B. O. & Symington, L. S. 2004, "Recombination proteins in yeast", *Annu.Rev Genet.*, vol. 38, pp. 233-271.
- Krokan, H. E., Standal, R., & Slupphaug, G. 1997, "DNA glycosylases in the base excision repair of DNA", *Biochem.J*, vol. 325 (Pt 1), pp. 1-16.
- Kundu, C. N., Balusu, R., Jaiswal, A. S., Gairola, C. G., & Narayan, S. 2007a, "Cigarette smoke condensate-induced level of adenomatous polyposis coli blocks long-patch base excision repair in breast epithelial cells", *Oncogene*, vol. 26, no. 10, pp. 1428-1438.
- Kundu, C. N., Balusu, R., Jaiswal, A. S., & Narayan, S. 2007b, "Adenomatous polyposis coli-mediated hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cell lines to methylmethane sulfonate treatment: implication of base excision repair pathways", *Carcinogenesis*, vol. 28, no. 10, pp. 2089-2095.
- Lamlum, H., Ilyas, M., Rowan, A., Clark, S., Johnson, V., Bell, J., Frayling, I., Efstathiou, J., Pack, K., Payne, S., Roylance, R., Gorman, P., Sheer, D., Neale, K., Phillips, R., Talbot, I., Bodmer, W., & Tomlinson, I. 1999, "The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis", *Nat.Med*, vol. 5, no. 9, pp. 1071-1075.
- Lane, D. P. & Crawford, L. V. 1979, "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells", *Nature*, vol. 278, no. 5701, pp. 261-263.

- Lane, J. D., Allan, V. J., & Woodman, P. G. 2005, "Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells", *J Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 17, pp. 4059-4071.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. 1997, "Genetic instability in colorectal cancers", *Nature*, vol. 386, no. 6625, pp. 623-627.
- Lindahl, T. & Wood, R. D. 1999, "Quality control by DNA repair", *Science*, vol. 286, no. 5446, pp. 1897-1905.
- Liu, B. H., Yu, F. Y., Wu, T. S., Li, S. Y., Su, M. C., Wang, M. C., & Shih, S. M. 2003, "Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin", *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, vol. 191, no. 3, pp. 255-263.
- Louie, R. K., Bahmanyar, S., Siemers, K. A., Votin, V., Chang, P., Stearns, T., Nelson, W. J., & Barth, A. I. 2004, "Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes", *J Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 7, pp. 1117-1128.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S., & Helleday, T. 2005, "Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks", *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 12, pp. 3799-3811.
- McDonald, S. A., Preston, S. L., Lovell, M. J., Wright, N. A., & Jankowski, J. A. 2006, "Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer", *Nat.Clin.Pract.Gastroenterol.Hepatol.*, vol. 3, no. 5, pp. 267-274.
- McNally, F. J. 2001, "Cytoskeleton: CLASPing the end to the edge", *Curr Biol.*, vol. 11, no. 12, p. R477-R480.
- Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Romano, J. W., & Ullrich, S. J. 1990, "Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 87, no. 16, pp. 6166-6170.
- Michalovitz, D., Halevy, O., & Oren, M. 1990, "Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53", *Cell*, vol. 62, no. 4, pp. 671-680.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N., & Tsukita, S. 2000, "The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules", *Curr Biol.*, vol. 10, no. 14, pp. 865-868.
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., & Nakamura, Y. 1992, "Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene", *Hum.Mol.Genet.*, vol. 1, no. 4, pp. 229-233.
- Mogensen, M. M., Tucker, J. B., Mackie, J. B., Prescott, A. R., & Nathke, I. S. 2002b, "The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells", *J Cell Biol.*, vol. 157, no. 6, pp. 1041-104.

- Moss, D. K., Betin, V. M., Malesinski, S. D., & Lane, J. D. 2006, "A novel role for microtubules in apoptotic chromatin dynamics and cellular fragmentation", *J Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 11, pp. 2362-2374.
- Munemitsu, S., Souza, B., Muller, O., Albert, I., Rubinfeld, B., & Polakis, P. 1994, "The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro", *Cancer Res.*, vol. 54, no. 14, pp. 3676-3681.
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E. A., & Lu, X. 2008, "A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress", *Nat.Rev Mol.Cell Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 702-712.
- Myung, K. & Kolodner, R. D. 2003, "Induction of genome instability by DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*", *DNA Repair (Amst)*, vol. 2, no. 3, pp. 243-258.
- Nagase, H. & Nakamura, Y. 1993, "Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene", *Hum.Mutat.*, vol. 2, no. 6, pp. 425-434.
- Narayan, S. & Jaiswal, A. S. 1997, "Activation of adenomatous polyposis coli (APC) gene expression by the DNA-alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine requires p53", *J Biol.Chem.*, vol. 272, no. 49, pp. 30619-30622.
- Narayan, S., Jaiswal, A. S., & Balusu, R. 2005, "Tumor suppressor APC blocks DNA polymerase beta-dependent strand displacement synthesis during long patch but not short patch base excision repair and increases sensitivity to methylmethane sulfonate", *J Biol.Chem.*, vol. 280, no. 8, pp. 6942-6949.
- Narayan, S. & Roy, D. 2003, "Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers", *Mol.Cancer*, vol. 2, p. 41.
- Nathke, I. 2006, "Cytoskeleton out of the cupboard: colon cancer and cytoskeletal changes induced by loss of APC", *Nat.Rev Cancer*, vol. 6, no. 12, pp. 967-974.
- Nature (2001) <http://www.nature.com/nature/insights/6835.html> [Lastet ned 10.11.2008].
- Olive, P. L., Wlodek, D., Durand, R. E., & Banath, J. P. 1992, "Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis", *Exp.Cell Res.*, vol. 198, no. 2, pp. 259-267.
- Pascucci, B., Russo, M. T., Crescenzi, M., Bignami, M., & Dogliotti, E. 2005, "The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells", *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 1, pp. 280-288.
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P., & Grasso, P. 1984, "Nitrosamine carcinogenesis in 5120 rodents: chronic administration of sixteen different concentrations of NDEA, NDMA, NPYR and NPIP in the water of 4440 inbred rats, with parallel studies on NDEA alone of the effect of age of starting (3, 6 or 20 weeks) and of species (rats, mice or hamsters)", *IARC Sci.Publ.* no. 57, pp. 627-665.
- Pines, A., Backendorf, C., Alekseev, S., Jansen, J. G., de Gruijl, F. R., Vrieling, H., & Mullenders, L. H. 2008, "Differential activity of UV-DDB in mouse keratinocytes and fibroblasts: Impact on DNA repair and UV-induced skin cancer", *DNA Repair (Amst)*.

- Polakis, P. 2007, "The many ways of Wnt in cancer", *Curr Opin Genet.Dev*, vol. 17, no. 1, pp. 45-51.
- Pommier, Y. 2006, "Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond", *Nat.Rev Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 789-802.
- Rowan, A. J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopoulou, A., Bicknell, D., Bodmer, W. F., & Tomlinson, I. P. 2000b, "APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits"", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 97, no. 7, pp. 3352-3357.
- Sansom, O. J., Griffiths, D. F., Reed, K. R., Winton, D. J., & Clarke, A. R. 2005, "Apc deficiency predisposes to renal carcinoma in the mouse", *Oncogene*, vol. 24, no. 55, pp. 8205-8210.
- Sauvaigo, S., Guerniou, V., Rapin, D., Gasparutto, D., Caillat, S., & Favier, A. 2004, "An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage", *Anal.Biochem.*, vol. 333, no. 1, pp. 182-192.
- Scholey, J. M., Brust-Mascher, I., & Mogilner, A. 2003, "Cell division", *Nature*, vol. 422, no. 6933, pp. 746-752.
- Segditsas, S. & Tomlinson, I. 2006, "Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway", *Oncogene*, vol. 25, no. 57, pp. 7531-7537.
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., & Costa, J. 1992, "Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 89, no. 10, pp. 4495-4499.
- Shrivastav, M., De Haro, L. P., & Nickoloff, J. A. 2008, "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice", *Cell Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 134-147.
- Sieber, O. M., Heinimann, K., Gorman, P., Lamlum, H., Crabtree, M., Simpson, C. A., Davies, D., Neale, K., Hodgson, S. V., Roylance, R. R., Phillips, R. K., Bodmer, W. F., & Tomlinson, I. P. 2002, "Analysis of chromosomal instability in human colorectal adenomas with two mutational hits at APC", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 99, no. 26, pp. 16910-16915.
- Signon, L., Malkova, A., Naylor, M. L., Klein, H., & Haber, J. E. 2001, "Genetic requirements for R", *Mol.Cell Biol.*, vol. 21, no. 6, pp. 2048-2056.
- Smith, K. J., Levy, D. B., Maupin, P., Pollard, T. D., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. 1994, "Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton", *Cancer Res.*, vol. 54, no. 14, pp. 3672-3675.
- Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., & Takeda, S. 2006, "Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair", *DNA Repair (Amst)*, vol. 5, no. 9-10, pp. 1021-1029.
- Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. 1998, "Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer", *Cancer Res.*, vol. 58, no. 6, pp. 1130-1134.

Sparks, A. B., Rider, J. E., & Kay, B. K. 1998, "Mapping the specificity of SH3 domains with phage-displayed random-peptide libraries", *Methods Mol.Biol.*, vol. 84, pp. 87-103.

Speit, G., Schutz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., & Hoffmann, H. 2004, "Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay", *Toxicol.Lett.*, vol. 146, no. 2, pp. 151-158.

Strathern, J. N., Shafer, B. K., & McGill, C. B. 1995, "DNA synthesis errors associated with double-strand-break repair", *Genetics*, vol. 140, no. 3, pp. 965-972.

Su, L. K., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. 1995, "APC binds to the novel protein EB1", *Cancer Res.*, vol. 55, no. 14, pp. 2972-2977.

TACS™ MTT Assays (2008) http://www.rndsystems.com/pdf/ta5355_5412.pdf [Latet ned 11.07.2007].

Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., & Takeda, S. 1998, "Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells", *EMBO J*, vol. 17, no. 18, pp. 5497-5508.

Taketo, M. M. 2006, "Wnt signaling and gastrointestinal tumorigenesis in mouse models", *Oncogene*, vol. 25, no. 57, pp. 7522-7530.

Tercero, J. A. & Diffley, J. F. 2001, "Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint", *Nature*, vol. 412, no. 6846, pp. 553-557.

Tighe, A., Johnson, V. L., & Taylor, S. S. 2004, "Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability", *J Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 26, pp. 6339-6353.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. 1979, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 76, no. 9, pp. 4350-4354.

van Es, J. H., Giles, R. H., & Clevers, H. C. 2001, "The many faces of the tumor suppressor gene APC", *Exp.Cell Res.*, vol. 264, no. 1, pp. 126-134.

Van, d. A., I, Van Laere, S. J., Van den Bosch, S. M., Van den Eynden, G. G., Trinh, B. X., van Dam, P. A., Colpaert, C. G., van, E. M., Van Marck, E. A., Vermeulen, P. B., & Dirix, L. Y. 2008, "Aberrant methylation of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene promoter is associated with the inflammatory breast cancer phenotype", *Br.J Cancer*.

Wagenaar, R. A., Crawford, H. C., & Matrisian, L. M. 2001, "Stabilized beta-catenin immortalizes colonic epithelial cells", *Cancer Res.*, vol. 61, no. 5, pp. 2097-2104.

Wang, T. C., Jan, K. Y., Wang, A. S., & Gurr, J. R. 2007, "Trivalent arsenicals induce lipid peroxidation, protein carbonylation, and oxidative DNA damage in human urothelial cells", *Mutat.Res.*, vol. 615, no. 1-2, pp. 75-86.

Whitehead, R. H. & Joseph, J. L. 1994, "Derivation of conditionally immortalized cell lines containing the Min mutation from the normal colonic mucosa and other tissues of an "Immortomouse"/Min hybrid", *Epithelial Cell Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 119-125.

Whitehead, R. H., VanEeden, P. E., Noble, M. D., Ataliotis, P., & Jat, P. S. 1993, "Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58 transgenic mice", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 90, no. 2, pp. 587-591.

Wyatt, M. D. & Pittman, D. L. 2006, "Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks", *Chem.Res.Toxicol.*, vol. 19, no. 12, pp. 1580-1594.

Yang, H., Jeffrey, P. D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N. H., Zheng, N., Chen, P. L., Lee, W. H., & Pavletich, N. P. 2002, "BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure", *Science*, vol. 297, no. 5588, pp. 1837-1848.

Yeo, C. J. 1999, "Tumor suppressor genes: a short review", *Surgery*, vol. 125, no. 4, pp. 363-366.

Zhou, B. B. & Elledge, S. J. 2000, "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective", *Nature*, vol. 408, no. 6811, pp. 433-439.

Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A., & Nathke, I. S. 2001, "Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation", *Curr Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 44-49.

6. Vedlegg 1

6.1 Kjemikalier

5 % Acrylamid gel

6, 2 ml dH₂O

2, 5 ml buffer A

1, 25 ml 40% acrylamid

50 µl 10% APS

5 µl TEMED

8 % acrylamid gel

5, 44 ml dH₂O

2, 5 ml buffer A

2, 0 ml 40% acrylamid

50 µl 10% APS

5 µl TEMED

0,75% agarose løsning (lavt smeltepunkt)

0,075 g NuSieve GTG Lav smelte agarose ble blandet med 10 mM EDTA- løsning.

Løsningen ble varmet opp kokepunktet til Agarosen var løst opp og løsningen ble holdt varm i varmebad på 37 °C

10% Ammonium persulfat (APS)

10 g APS

100 ml dH₂O

Lagret på -20°C

Blottebuffer (1 liter til 1 kar)

100 ml 10X blottebuffer

200 ml metanol

700 ml dH₂O

10X blottebuffer

30 g Tris-base

144 g Glycin

Volumet ble justert til 1 liter med dH₂O

Buffer A

1, 5 M Tris-base ble blandet med

0, 4 % SDS

pH ble deretter justert til 8,8 med HCl før volumet ble justert til 100 ml med dH₂O

Buffer B

0, 5 M Tris- base

0, 4 % SDS

pH 6,8 med HCl, deretter ble volumet justert til 100 ml med dH₂O

10mM EDTA- løsning (for 0,75% Agarose løsning)

1,86 g Na₂EDTA

500 ml PBS uten Ca og Mg

pH ble justert til 7,4 med NaOH

Elektroforesebuffer (400 ml til 1 kar)

80 ml 5X elektroforese buffer

320 ml dH₂O

Elektroforesebuffer til Western

15 g Tris-base

72 g glycin

5 g SDS

Volumet ble justert til 1 l med dH₂O

Elektroforesestock (5 liter) 10X komet

600 g (litt om gangen, hvis ikke ble det veldig varmt) ble løst i 3M NaOH og 18, 6 g 0,01M

EDTA i 4 l dH₂O. Det ble fylt opp til 5 l med dH₂O

Enzymreaksjonsbuffer til Komet (5 liter)

40mM Hepes,

0,1M KCl

0,5mM EDTA

4 l dH₂O

pH ble justert til 7,6 med 7M KOH og det ble fylt opp til 5 l med dH₂O

Fix løsninger Western

200 ml konsentrert Kodak X-ray fixer

800ml dH₂O

Oppbevart i lystette flasker

Fosfat buffer løsning (PBS):

0,90 g Natriumdihydrogen-fosfat-Monohydrat (NaH₂PO₄ x 2H₂O)

4,93 g av Dinatriumhydrogenfosfat-Dihydrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O)

40,5 g Natriumclorid (NaCl)

Fylte opp med dH₂O til 5 l. Dette ble fordelt på 1 l flasker og satt på kjølerommet. Denne løsningen ga pH 7,66

Fosfat buffer løsning med 10 mM EDTA

1,86 g EDTA

0,5 l romtemperert PBS uten Ca og Mg (pH 7,4)

pH ble justert til 7,4

Fremkalling Western

200 ml konsentrert Kodak x-ray developer

800ml dH₂O

Oppbevart i lystette flasker

L-Glutamin (Fw/Mw 146, 15, 5 ml)

1,46 g/ ml sterilt vann. Løsningen ble sterilfiltrert.

Lyseringsstock (4,45 liter)

2,5 M NaCl

100 mM EDTA

10 mM Tris-base

37,5 g NaOH (s) pellet i 3 l dH₂O

Deretter ble 50 g N-Lauroylsarcosine sodium salt tilsatt med munnbind. Løsningen ble satt på røring over natt for å løse alt. Så ble løsningen fylt opp til litt under 4 l med dH₂O og justert til pH 10 med HCl eller NaOH. Løsningen ble så etterfylt med dH₂O til 4,45 l og sterilfiltrert i cellebenk.

Medium til cellene

500 ml D-MEM

50 ml FCS

5,5 ml PEN-STREP

5 ml L-glutamin

Nøytraliseringsbuffer (5liter)

242,5 g Tris-base

4 l dH₂O

Løsningen ble PH justert til 7,5 med HCl og det ble fylt opp til 5 l med dH₂O.

10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

10g SDS

100 ml med dH₂O

Løsningen ble sterilfiltrert/autoklavert

Stacking gel:

6,44 ml dH₂O

2,5 ml buffer B

1,0 ml 40% acrylamid

50 µl 10% APS

10 µl TEMED

2% SDS og BFB(150 ml) sample buffer

0,5 M Tris-base, pH 6,8

30 ml Glycerol

10% SDS
11,25 ml 2-mercaptoetanol
0,05 % (w/v) bromfenol blå
Fylte opp med dH₂O til 150.

TE-buffer til Kometavlesning

200mM EDTA
0,5M Tris HCl
0,8 l dH₂O
pH ble justert til 8,0 og det ble fylt opp med dH₂O til 1 l

Tetra.

10 mg Tetra. ble løst i en ml sterilfiltrert dH₂O. Løsningen ble sterilfiltrert og det ble hentet 10 µl av denne løsningen og blandet med 1 ml sterilfiltrert dH₂O. Det ble igjen hentet ut 10 µl og blandet med 1 ml sterilfiltrert dH₂O. Det ble tilsatt 1 µl /100 ml medium.
Sluttkonsentrasjonen i mediet ble da 0,01 µg/ ml.

Terazolium stoff MTT

5 mg/ml Terazolium stoff MTT ble løst i PBS. Løsningen ble sterilfiltrert ved bruk av steril trakt.

6. 2 Produkter og produsenter

Produkt	Produsent	Land
2-Mercaptotenol	Sigma Aldrich	USA
2-propanol	Rathburn	skottland
Absolutt alkohol prima (100%	Arkus K	Norge

ethanol)

Aceton	Merck	Tyskland
40% acrylamid	Bio Rad	USA
Albumin bovine (BSA)	Sigma Aldrich	USA
10% Amonium persulfat (APS)	Sigma Aldrich	USA
Anti APC (Ab-1)	Calbiochem	Tyskland
Bromfenol	Fluka	Sveits
Camptothecin (Camp.)	Sigma Aldrich	USA
Cellulose filter papir	Sigma Aldrich	USA
Dimethyl sulphoxide (DMSO)	Merck	Tyskland
Dulbecco`s Modified Eagle Medium m/ high glukose (D- MEM)	VWR	USA
Ethylenediaminetetraacetin acid disodium salt dihydrate (EDTA- Na ₂)	Sisma Aldrich	USA
Engangs plast kuvetter	Plastic Brand	Tyskland
Film (fremkalling western)	Kodak	USA

Foetal Bovine Serum (FCS)	Euro Clone	Italia
Full Range Rainbow TM Recombinant Protein Molecular weight marker	Cambrex	USA
Glycerol	Sigma Aldrich	USA
Glycin	Sigma Aldrich	USA
Hydrogen chloride (HCl)	Merck	Tyskland
Hygromycin B	Invitrogen	USA
Kalium kloride (KCl)	Merck	Tyskland
Kodak X-ray developer	Kodak	USA
L-Glutamin	Sigma aldrich	USA
Metanol	Lab-Scan	Polen
Methylmethane sulfonate (MMS)	Sigma Aødrich	USA
MTT-brett	Sartedt	Tyskland
Natriumdihydrogen-fosfat- Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck	Tyskland
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck	Tyskland
P53	Novocastra	England

PEN-STREP	Lonza	Belgia
Polyclonal Goat Anti- Rabbit Immunoglobulins/ HRP	Dako	Danmark
Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunoglobulins/ HRP	Dako	Danmark
ProSive ® Protein Markers	Ge Healthcare	England
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific	USA
N,N,N',N'-tetra-methyl- ethylenedamine (TEMED)	Bio Rad	USA
Tetrazolium stoff MTT	Sigma Aldrich	USA
Tris-base	Sigma Aldrich	USA
Trypsin EDTA	Lonza	Belgia
Tween	Merck	Tyskland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Fluka	Sveits
SYBR® Gold	Invitrogen	USA

* Avdelingen for kjemikalietoksikologi

